

Rimonabants effekter på farmakokinetikken til ciklosporin A og takrolimus i nyretransplanterte pasienter

Ida Robertsen



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15.mai 2008

Rimonabants effekter på farmakokinetikken til ciklosporin A og takrolimus i nyretransplanterte pasienter

Ida Robertsen



Mastergradsoppgave i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15.mai 2008

Veiledere

Professor Anders Åsberg

Overlege Karsten Midtvedt

Forord

Denne mastergradsoppgaven er utført under veiledning av professor Anders Åsberg ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap og overlege Karsten Midtvedt ved Rikshospitalet. Arbeidet ble påbegynt i juni 2007 og avsluttet i mai 2008.

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til Anders Åsberg for svært god oppfølging og engasjerende veiledning. Tusen takk for ditt gode humør, verdifulle innspill og for lange, men riktig så trivelige dager på Rikshospitalet. En stor takk rettes også til stipendiat Rune Amundsen for mange gode råd og hyggelig selskap både på lab og på Rikshospitalet. Takk for ditt evigvarende gode humør og for at du alltid tar deg tid til både stort og smått.

En stor takk for rekruttering og organisering av pasienter til Karsten Midtvedt som har fungert som ekstern veileder. Tusen takk til bioingenørene ved Nyrefysiologisk laboratorium ved Rikshospitalet, spesielt Jean Stenstrøm, for hjelp og veiledning med blodprøvetakingen.

Mange takk også til stipendiat Pål Falck ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap for opplæring i metoder, og for at du har tatt deg tid til å svare på alle mulige slags spørsmål. Takk til bioingenør Siri Johannesen ved samme avdeling for god hjelp og hyggelig selskap på Rikshospitalet.

Tusen takk til alle pasientene som gjorde denne studien mulig å gjennomføre.

Til slutt en spesiell takk til venner og familie for forståelse og oppmuntring, og ikke minst til alle medstudenter, spesielt gjengen i 4 etasje, for et morsomt, til tider slitsomt, men uforglemmelig år.

Blindern, 15. mai 2008

Ida Robertsen

Innhold

FORKORTELSER	6
SAMMENDRAG	8
1. INNLEDNING	10
1.1 NYRETRANSPLANTASJON	10
1.2 KALSINEURINHEMMERE	11
1.2.1 Virkningsmekanisme	11
1.2.2 Terapeutisk bruk	12
1.2.3 Farmakokinetikk	13
1.2.4 Bivirkninger	15
1.3 KARDIOVASKULÆR SYKDOM, INSULINRESISTENS OG FEDME HOS NYRETRANSPLANTERTE	16
1.3.1 Hypertensjon	16
1.3.2 Dyslipidemi	17
1.3.3 Insulinresistens	17
1.3.4 Overvekt og fedme	17
1.4 RIMONABANT	18
1.4.1 Det endocannabinoide system og rimonabant	19
1.4.2 Terapeutisk bruk	21
1.4.3 Farmakokinetikk	21
1.4.4 Bivirkninger	22
1.5 MÅL MED OPPGAVEN	22
2. MATERIALE OG METODER	24
2.1 PASIENTER	24
2.2 STUDIEDESIGN	24
2.3 FARMAKOKINETIKK UNDERSØKELSER	25
2.4 ORAL GLUKOSE TOLERANSE TEST	26
2.5 ANALYSEMETODER FOR CSA OG TAC	26
2.5.1 Konsentrasjonsbestemmelse av CsA og hovedmetabolitter	27
2.5.2 Konsentrasjonsbestemmelse av Tac	29
2.5.3 Beregning av farmakokinetiske parametere	30
2.5.4 Statistisk analyse	30
3. RESULTATER	32
3.1 PASIENTENE	32
3.1.1 Bivirkninger	33

3.1.2	<i>Compliance</i>	34
3.2	CIKLOSPORIN A FARMAKOKINETIKK	34
3.3	TAKROLIMUS FARMAKOKINETIKK	37
3.4	ORAL GLUKOSE TOLERANSE TEST	38
3.5	GENOTYPING AV CYP OG P-GP	38
4.	DISKUSJON	39
4.1	FARMAKOKINETISK INTERAKSJONSUNDERSØKELSE	39
4.2	INSULINSENSITIVITET	41
4.3	VEKTREDUKSJON AV RIMONABANT	42
4.4	BIVIRKNINGER OG SIKKERHETSPARAMETERE	43
5.	KONKLUSJON	45
5.1	FREMTIDSUTSIKTER	45
6.	KILDELISTE	46
APPENDIKS	50
REAGENSER	50
LØSNINGER	51
UTSTYR	52
DEMOGRAFISKE PARAMETERE FOR PASIENTENE	53
FARMAKOKINETISKE PARAMETERE FOR CsA-PASIENTENE	54
INDIVIDUELLE KONSENTRASJONER AV CsA	55
INDIVIDUELLE KONSENTRASJONER AV TAC	56
STUDIEPROTOKOLL	57
PASIENTINFORMASJON OG SAMTYKKEERKLÆRING	68

Forkortelser

ABCB1	Gen som koder for blant annet P-gp
ACN	Acetonitril
AM1	Ciklosporin A metabolitt hydroksylert på aminosyre 1
AM19	Ciklosporin A metabolitt hydroksylert på aminosyre 1 og 9
AM1c	Ciklosporin A metabolitt hydroksylert og syklisert på aminosyre 1
AM1c9	Ciklosporin A metabolitt hydroksylert og syklisert på aminosyre 1 og hydroksylert på aminosyre 9
AM4N	Ciklosporin A metabolitt N-demetylerert på aminosyre 4
AM9	Ciklosporin metabolitt hydroksylert på aminosyre 9
APCI	Kjemisk ionisasjon ved atmosfæretrykk
AUC	Area under the time-concentration curve (arealet under konsentrasjonstidskurven)
BMI	Body Mass Index (kroppsmasseindeks)
C ₀	Konsentrasjonen like før dose
C ₂	Konsentrasjonen 2 timer etter dose
CB-1	Cannabinoid reseptor type 1
CB-2	Cannabinoid reseptor type 2
CL	Clearance
C _{max}	Maksimal konsentrasjon
CP	Cyclophilin (cyklofilin)
CRF	Case report form
CsA	Ciklosporin A
CsC	Ciklosporin C
CYP	Cytokrom P450
DD	Deceased donor (avdød donor)
EC	Det endocannabinoide system
F	Biotilgjengelighet
FKBP	FK-bindende proteiner
g	Måleenhet for relative sentrifugekraft

GFR	Glomerulær filtrasjonsrate
Graft	Transplantert vev/organ
HDL	High density lipoproteiner
HLA	Human leukocyt antigen
HPLC	High performance liquid chromatography (væskekromatografi)
I.S.	Intern standard
IL-2	Interleukin-2
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry (væskekromatografisk tandem massespektrometri)
LD	Living donor (levende donor)
LDL	Low density lipoproteiner
m/z	Masse/ladning ratio
MDR1	Multidrug resistance 1 genet som nå kalles ABCB1
MMF	Mykofenolat mofetil
MRM	Multiple reaction monitoring
NFAT	Nukleær faktor for aktiverte T-lymfocytter
OGTT	Oral glukose toleranse test
P-gp	P-glykoprotein
PTDM	Posttransplantasjon diabetes mellitus
QC	Quality control (kvalitetskontroll)
RIO	Rimonabant In Obesity
SD	Standardavvik
SEM	Standardfeil
$T_{1/2}$	Halveringstid
Tac	Takrolimus
TCR	T-celle reseptor
TG	Triglyserider
T_{\max}	Tiden fra inntak av legemiddel til C_{\max}
Tx	Transplantasjon
Vd	Distribusjonsvolum
WHO	Verdens Helse Organisasjon

Sammendrag

Bakgrunn: De siste årene har overvekt og fedme blitt et økende problem hos nyretransplanterte pasienter, og bidrar til en økt risiko for kardiovaskulær sykdom. Kardiovaskulær sykdom er allerede den vanligste dødsårsaken hos nyretransplanterte, og det er derfor et stort behov for å minimere risikofaktorer for kardiovaskulær morbiditet og mortalitet hos denne pasientpopulasjonen. Nyretransplanterte blir behandlet med en livslang immunsuppresjonsterapi, der kalsineurinhemmerene CsA og Tac, utgjør grunnsteinene. Begge legemidlene er karakterisert av et smalt terapeutisk vindu. Det er derfor svært viktig at alle nye legemidler vurderes som å ha et potensial til å påvirke CsA eller Tac konsentrasjoner inntil data eller erfaring tilsier det motsatte. Rimonabant er et nytt legemiddel, som i tillegg til sine vektreduserende egenskaper, også har vist gunstige effekter på andre risikofaktorer for kardiovaskulær sykdom av interesse for nyretransplanterte pasienter. En interaksjonsstudie mellom kalsineurinhemmerene og rimonabant har ikke tidligere blitt utført.

Mål og metoder: I denne studien ble effektene av rimonabant på farmakokinetikken til CsA og Tac undersøkt i 18 pasienter med stabil nyrefunksjon. Pasientene brukte enten CsA (n = 10) eller Tac (n = 8), i tillegg til steroider og mykofenolat. 12-timers farmakokinetikk undersøkelser for å måle CsA og Tac konsentrasjoner ble utført før og etter en to måneders lang behandlingsperiode med 20 mg rimonabant daglig. Det ble i tillegg utført en oral glukosebelastning både før og etter rimonabantbehandlingen for å undersøke om pasientenes insulinsensitivitet ble forbedret av rimonabant. Det ble også observert om rimonabantbehandlingen førte til en reduksjon av kroppsvekten til pasientene.

Resultater: En to måneders lang behandlingsperiode med rimonabant induserte en moderat $23 \pm 56 \%$, men signifikant økning i CsA AUC_{0-12} ($p = 0,043$) etter at seks av pasientene var analysert. Farmakokinetikken til Tac endret seg ikke i noen relevant grad og nyrefunksjonen til pasientene holdt seg stabil under rimonabantbehandlingen. Det ble i tillegg vist en signifikant nedgang i vekt/BMI etter behandling med rimonabant. Insulinsensitiviteten viste derimot ingen forbedring etter den to måneders lange rimonabantbehandlingen.

Konklusjon: En samtidig administrering av rimonabant i to måneder viste en moderat effekt på farmakokinetikken til CsA. Dette er av et omfang som det må ta hensyn til i klinikken,

sett at analysene av de tre siste pasientene viser den samme tendensen. Farmakokinetikken til Tac ble ikke påvirket i noen relevant grad, og dette indikerer at det vil være trygt å administrere rimonabant samtidig med Tac i nyretransplanterte pasienter. Rimonabant induserte en svak nedgang i vekt/BMI, men hadde ingen effekt på insulinsensitiviteten etter den to måneders lange behandlingsperioden.

1. Innledning

1.1 Nyretransplantasjon

Alle organtransplantasjoner i Norge utføres ved Rikshospitalet, og dette gjør Rikshospitalet til det største transplantasjonssenteret i Europa [1]. Det er i dag over 50 år siden den første kliniske organtransplantasjonen i Norge og Norden ble foretatt, og dette var nettopp en nyretransplantasjon [2]. Nyretransplantasjon er den vanligste formen for transplantasjon, og er ofte det beste behandlingsalternativet for pasienter med nyresykdom i slutfasen. En transplantasjon utføres når nyrefunksjonen er så nedsatt at pasienten er i en livstruende situasjon dersom det ikke gis nyreerstattende behandling (dialyse), eller når legemidler ikke lenger gir tilstrekkelig kontroll over plagene nyresvikt medfører. Hypertensjon, diabetes mellitus og kronisk pyelonefritt er de vanligste sykdommene som fører til en nyretransplantasjon [3].

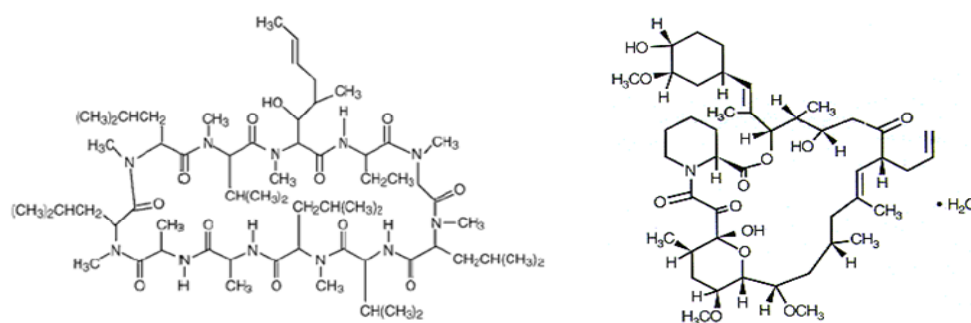
Det utføres stadig flere nyretransplantasjoner på Rikshospitalet, både fra avdød (DD) og levende donor (LD). I 2006 ble det utført totalt 212 nyretransplantasjoner i Norge [4], mens tallet økte til 260 utførte nyretransplantasjoner i 2007 [5]. Per 1. januar 2008 står 242 personer på ventelisten i Norge for en ny nyre [5].

En transplantasjon mellom to genetisk forskjellige individer blir kalt en allogen transplantasjon. Immunresponser mot transplanterte vev eller organer skjer på grunn av genetiske forskjeller mellom donor og mottaker. Den viktigste forskjellen er de antigenetiske forskjellene i de polymorfe human leukocyt antigen (HLA) molekylerne. For å redusere de genetiske forskjellene som induserer til reaksjoner er det derfor gunstig at donor og mottaker er mest mulig vevsforlikelige. Dette innebærer at blodtype og HLA type hos potensiell donor og mottaker bør være så like som mulig [6]. Etter transplantasjonen vil immunforsvaret til den transplanterte kjenne igjen fremmede antigener på cellene til det transplanterte organet. Dette vil starte en immunreaksjon som kan føre til reaksjon. For å forhindre reaksjon av graftet etter transplantasjonen må immunforsvaret til den transplanterte dempes. De transplanterte pasientene blir derfor behandlet med en kombinasjon av immunsuppressive legemidler. Standard protokoll for immunsuppressiv

behandling ved Rikshospitalet er et trippelregime bestående av en kalsineurinhemmer (ciklosporin eller takrolimus), mykofenolat (MMF) og prednisolon, i tillegg til basiliximabinduksjon ved transplantasjonstidspunktet. Diabetikere og pasienter over 50 år får ciklosporin (CsA), mens de resterende får takrolimus (Tac) som kalsineurinhemmer.

1.2 Kalsineurinhemmere

CsA og Tac utgjør grunnsteinene i den immunsuppressive vedlikeholdsbehandlingen, og blir kalt kalsineurinhemmere på grunn av deres evne til å hemme denne utbredte fosfatasen. Introduksjonen av CsA for over 20 år siden blir sett på som et av de store gjennombruddene i moderne medisin, og gjorde det mulig blant annet å transplantere hjerter [7]. CsA, bestående av 11 aminosyrer, ble første gang isolert fra sopparten *Tyloporcladium inflatum gams* i jordprøver fra Hardangervidda [8]. I 1983, 13 år etter oppdagelsen, ble CsA markedsført internasjonalt som et immunsuppressivt legemiddel for å hindre rejeksjon av transplanterte organer [7]. Tac ble oppdaget tidlig på 1980-tallet av forskere ved Fujisawa Pharmaceuticals som undersøkte en jordsopp kalt *Streptomyces tsukubaensis*. Denne sopparten produserte et potent immunsuppressivt stoff som ble gitt koden FK506, senere kalt Tac [7]. Selv om CsA og Tac strukturelt sett (Figur 1) ikke er relaterte, virker de hovedsakelig ved samme mekanisme [9].

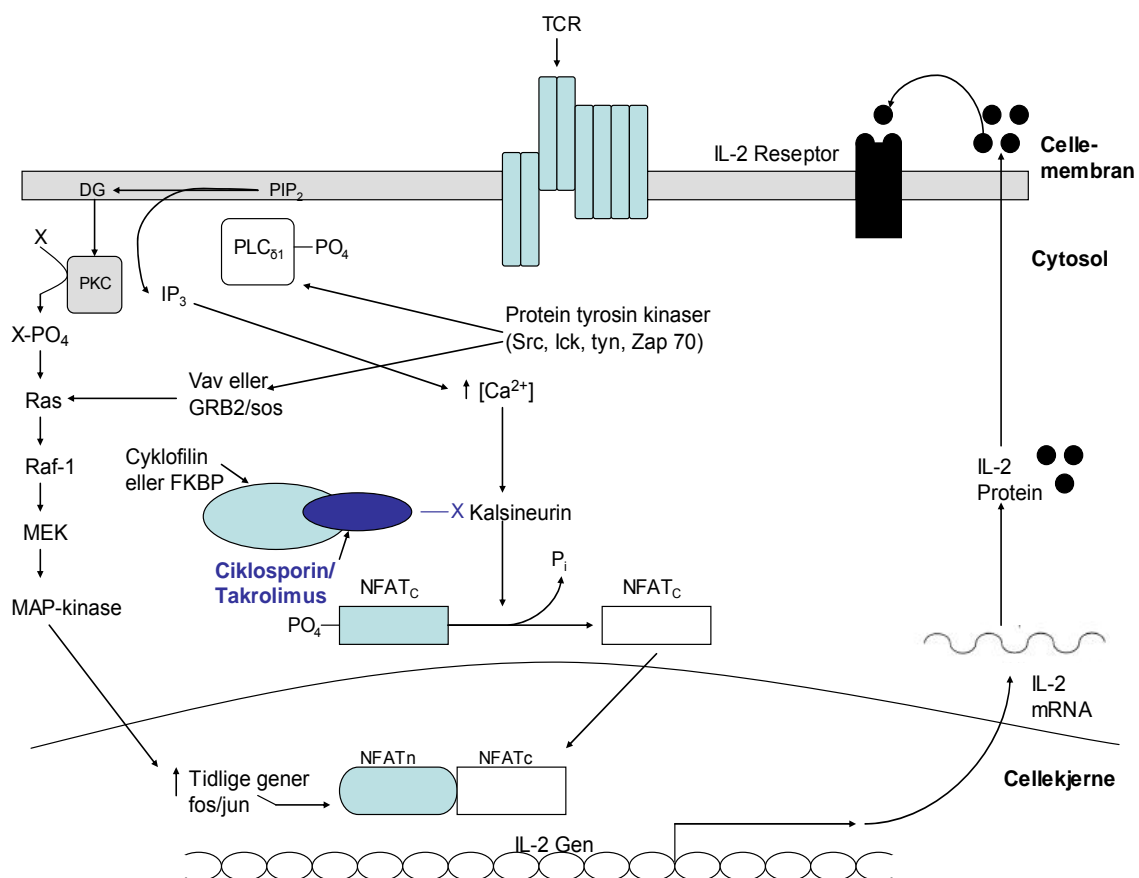


Figur 1: Strukturen til ciklosporin A (venstre) og takrolimus (høyre)

1.2.1 Virkningsmekanisme

Figur 2 viser hvordan CsA og Tac reduserer cytotoxisk T-celle aktivering ved å hemme det samme intermediære signaleringsproteinet, kalsineurin [3]. CsA binder seg til cyclofilin (CP), et intracellulært protein i T-celler, mens Tac binder seg til FK-bindende proteiner

(FKBP) som er strukturelt relatert til CP. Hvert av disse kompleksene hemmer så fosfatase aktiviteten til kalsineurin. Dermed forhindres en defosforylering av nukleær faktor for aktiverte T-lymfocytter (NFAT), som er essensiell for at NFAT skal kunne bevege seg inn i cellekjernen. [6, 7]. NFAT er nødvendig for å indusere et antall av cytokine gener, inkludert genet for interleukin-2 (IL-2) [9]. Som følger av dette blokkerer CsA og Tac gentranskripsjonen av interleukin-2 og andre cytokiner under tidlige stadier av T-celle aktivering, og hindrer dermed en immunrespons mot det transplanterte graftet [10].



Figur 2: Virkningsmekanismen til ciklosporin A (CsA) og takrolimus (Tac). Både CsA og Tac binder seg til immunofiliner (cyklofilin og FKBP), og danner så et kompleks som binder fosfatasen kalsineurin og hemmer kalsineurin-katalysert defosforylering. Denne defosforyleringen er essensiell for at nukleær faktor for aktiverte T-celler (NFAT) skal kunne bevege seg inn i kjernen. I cellekjernen induserer NFAT transkripsjonen av interleukin-2 (IL-2) og andre vekst- og differensieringsassosierte cytokiner. TCR = T-celle reseptor [9].

1.2.2 Terapeutisk bruk

CsA og Tac blir brukt som profylakse mot reaksjon av transplanterte organer. Behandling med CsA eller Tac reduserer akutte reaksjon episoder og forbedrer pasient- og

graftoverlevelsen. CsA blir brukt for å hindre organfrastøtning i nyre-, lever-, hjerte og lunge, samt kombinert hjerte-lunge transplantasjon. Tac blir hovedsakelig brukt i nyre-, nyre-pankreas- og levertransplanterte [11]. CsA blir også brukt ved en rekke autoimmune sykdommer som endogen uveitt, reumatoid artritt, psoriasis og ved atopisk dermatitt [12].

1.2.3 Farmakokinetikk

Kalsineurinhemmerene er legemidler karakterisert av et smalt terapeutisk vindu, og har en variabel intra- og interindividuell farmakokinetikk. Det kreves derfor en tett legemiddelmonitorering for å optimalisere effekten og begrense toksisiteten av disse legemidlene [13].

Absorpsjon og distribusjon

Både CsA og Tac har en ufullstendig og variabel absorpsjon etter oral administrasjon [9]. CsA blir hovedsakelig absorbert i tynntarmen [14], mens det har blitt vist at Tac kan absorberes gjennom hele mage-tarmkanalen hos mennesker [11]. Biotilgjengeligheten er generelt lav for begge legemidlene etter peroral administrasjon. CsA (Neoral®) har en biotilgjengelighet mellom ca 30-60 % [12], og den gjennomsnittelige biotilgjengeligheten til Tac er i området 20-25 % [11].

Etter intestinal absorpsjon vil majoriteten av CsA, på grunn av sine sterke lipofile egenskaper, forlate blodbanen og akkumulere i leukocyt- og fettrike vev [7]. Distribusjonsvolumet til CsA varierer mellom 0,9-8 L/kg, med et gjennomsnitt på 3,5 L/kg. I blodet er ca 60 % av CsA bundet til røde blodceller, og i plasma er 85-90 % bundet til lipoproteiner, vanligst "high-density" lipoproteiner (HDL) [15]. Tac er også et svært lipofilt legemiddel [15] og har en utstrakt distribusjon i kroppen [11]. Tac bindes sterkt til røde blodceller, og fullblodkonsentrasjoner er derfor 10-30 ganger høyere enn hva som er tilfelle i plasma [11]. I motsetning til CsA ser det ikke ut til at Tac er assosiert med lipoproteiner i plasma, men er primært bundet til α_1 -surt glykoprotein [3]. Distribusjonen av både CsA og Tac er påvirket av hematokrit og konsentrasjon [3, 14]. Konsentrasjonsbestemmelser av CsA og Tac i fullblod er en mer robust metode enn plasmamålinger, og benyttes derfor klinisk.

Effluks via P-glykoprotein

Både CsA og Tac er substrat for og hemmer av den energiavhengige efflukspumpen P-glykoprotein (P-gp) som kodes av "multidrug resistance 1" (MDR1) genet, også kalt *ABCB1* genet [16, 17]. Ekspresjonen av P-gp er høy i tarmvegg, galleganger og nyretubuli [18]. Videre er P-glykoproteinnivået høyt i interne barrierer, slik som blod-hjerne-barrieren, blod-placenta-barrieren og blod-testis-barrieren, og i ulike typer av immunceller, inkludert T-celler hvor CsA/Tac utøver sin immundempende effekt [18]. Både intra-og interindividuelle farmakokinetiske variasjoner for CsA og Tac kan være relatert til variabel ekspresjon og aktivitet av P-gp [19]. Flere enkle nukleotid polymorfismer har blitt identifisert i *MDR1*-genet, og noen av disse er assosiert med en manglende proteinekspresjon og redusert *in vivo* aktivitet [19].

Eliminasjon

Blodkonsentrasjoner av CsA følger generelt en bifasisk eliminasjon. I voksne med en normal lever- og nyrefunksjon er den initielle halveringstiden rapportert til å være gjennomsnittelig 1,2 timer, mens den gjennomsnittelige terminale halveringstiden er fra 8 til 27 timer [14]. Etter en transplantasjon vil clearance av CsA fra blodet være ca 0,3 til 0,4 L/t/kg. Halveringstiden til Tac er lengre, men like variabel som CsA. Hos friske personer var gjennomsnittelig halveringstid i fullblod ca 43 timer, sammenlignet med 15 timer hos voksne nyretransplanterte. Tac har en lav clearance. Hos friske individer er gjennomsnittelig clearance estimert fra fullblodkonsentrasjoner til 2,25 L/t, mens hos nyretransplanterte er verdien 6,71 L/t. Den høye clearanceverdien medvirker til den kortere halveringstiden som er observert hos nyretransplanterte [11].

Metabolisme

CsA og Tac metaboliseres i stor grad av det hepatiske cytokrom P (CYP) 450 enzymsystemet [20, 21]. CsA blir metabolisert til over 30 metabolitter, hvor metabolittene viser kun minimal eller ingen immunsuppressiv aktivitet [14]. Det eksakte antallet på Tac-metabolitter er ukjent, men det er rapportert å være så mye som 15 eller flere [7]. En av disse metabolittene har vist immunsuppressiv aktivitet *in vitro* som ligner den for Tac [11]. De andre metabolittene har svak eller ingen immunsuppressiv effekt [11]. Det er CYP3A isoenzymene, primært CYP3A4, men også CYP3A5 er ansvarlig for metabolismen av CsA og Tac i mennesker. CYP3A4 og CYP3A5 uttrykkes, akkurat som P-gp, i høy grad i

tarmcellene og kan derfor redusere biotilgjengeligheten til mange legemidler. CYP3A4 og CYP3A5 er også konsentrert i leveren og står for mesteparten av hepatisk og systemisk clearance av både CsA og Tac [22]. Selv om det har blitt identifisert et antall av polymorfe *CYP3A4* alleler er disse sjeldne og bidrar ikke til variabilitet i CYP3A4 ekspresjonen. I motsetning til CYP3A4 er CYP3A5 polymorft uttrykt [13, 23]. Større mengder aktivt CYP3A5-enzym er bare uttrykt hos mennesker som har minst et villtype *CYP3A5*1* allel. Det er beskrevet mange ulike *CYP3A5* alleler som medfører fravær av aktivt CYP3A5-enzym [22, 24]. Av disse er *CYP3A5*3* det vanligste og skyldes en enkel nukleotid polymorfisme som forårsaker alternativ spleising og forkorting av CYP3A5-proteinet. Det har blitt estimert at CYP3A5 kan representere så mye som 50 % av total hepatisk CYP3A hos individer som er bærere av villtypeallelet [24]. CYP3A5-polymorfisme kan derfor være en viktig årsak til interindividuell variasjon av CYP3A-aktivitet [22]. Pasienter med minst et *CYP3A5*1* allel kan derfor trenge høyere doser av legemidlet for å oppnå terapeutisk respons.

Siden både CsA og Tac i høy grad blir metabolisert av CYP3A, som er ansvarlig for mer enn halvparten av metabolismen til alle legemidler, er sjansen for en legemiddelinteraksjon svært stor. Det smale terapeutiske vinduet til disse legemidlene understreker viktigheten av å monitorere legemiddelinteraksjoner for å forhindre toksisitet, og for å unngå for lave blodkonsentrasjoner som kan føre til rejeksjon av graftet. Legemidler som induserer P450 enzymer, som for eksempel fenobarbital og karbamazepin, øker CsA og Tac metabolismen og reduserer dermed konsentrasjonen. På den andre siden vil legemidler som erytromycin og ketokonazol resultere i en økning i CsA og Tac konsentrasjon via en hemming av CYP3A4, noe som vil øke risikoen for bivirkninger [15]. Det er derfor svært viktig at alle nye legemidler vurderes å ha et potensial for å endre CsA eller Tac konsentrasjoner inntil data eller erfaring tilsier det motsatte [15].

1.2.4 Bivirkninger

Bivirkningsprofilen forbundet med immunsuppressive legemidler kan ofte være vanskelig å fastlegge på grunn av den underliggende sykdommen og samtidig bruk av flere legemidler [11]. Klinisk viktige bivirkninger av CsA og Tac inkluderer nefrotoksisitet og kardiovaskulære risikofaktorer som hypertensjon, hyperlipidemi og hyperglykemi [10]. Nefrotoksisitet er doseavhengig og ofte hovedårsaken til brudd i eller forandring av

behandlingen [9]. Doserelatert neurotoksisitet kan oppstå ved bruk av begge legemidlene, men er vanligere ved Tac-behandling. Selv om begge legemidlene er assosiert med glukoseintoleranse oppstår også dette oftere ved behandling med Tac sett i forhold til CsA [3]. Behandling med CsA eller Tac vil, som ved bruk av andre immunsuppressive legemidler, også kunne gi en økt risiko for kreft og opportunistiske infeksjoner [9].

1.3 Kardiovaskulær sykdom, insulinresistens og fedme hos nyretransplanterte

Introduksjonen av kalsineurinhemmerene har forbedret overlevelsen hos transplanterte pasienter. Den forventede levealderen til nyretransplanterte har økt betraktelig. Overlevelsen er likevel forkortet først og fremst på grunn av kardiovaskulær sykdom hos denne pasientpopulasjonen [25]. Den årlige risikoen hos nyretransplanterte for død på grunn av kardiovaskulær sykdom er 3,5-5 %. Dette er en 50 ganger høyere risiko enn hva som er reelt i den generelle populasjonen [26]. Det metabolske syndromet er en stor risikofaktor for hjerte- og karsykdom i den generelle populasjonen. Det er trolig at den økte risikoen for hjerte- og karsykdom hos nyretransplanterte skyldes at nyretransplanterte ofte har en samling av risikofaktorer assosiert med det metabolske syndromet som hypertensjon, dyslipidemi, insulinresistens og fedme [27].

1.3.1 Hypertensjon

Hypertensjon, definert som systemisk blodtrykk $> 140/60$, er den vanligste risikofaktoren for hjerte- og karsykdom hos nyretransplanterte. Flere faktorer bidrar til patogenesen av hypertensjon etter en transplantasjon, blant annet hypertensjon før transplantasjon, høy "body mass index" (BMI), primær nyresykdom, kvalitet på donororganet og behandling med kalsineurinhemmere og glukokortikoider [26]. Indirekte bevis viser at det er hypertensjon før transplantasjon og behandling med kalsineurinhemmere som er de viktigste årsakene til hypertensjon etter en transplantasjon [26].

1.3.2 Dyslipidemi

Dyslipidemi blir definert som unormale mengder av og/eller en uheldig fordeling mellom ulike lipider i blodet, og er en uavhengig risikofaktor for kardiovaskulære sykdom [28]. Det er en høyere insidens av dyslipidemi hos transplanterte enn hva som er tilfelle i den generelle populasjonen [29]. Årsakene til dette er flere og kan blant annet skyldes proteinuri, diabetes mellitus, fedme, redusert nyrefunksjon og ikke minst immunsuppressiv behandling [30, 31]. Hyperlipidemi forårsaket av immunsuppressiv behandling kan knyttes både til CsA og glukokortikoidene, og ser ut til å være doseavhengige [32].

1.3.3 Insulinresistens

Insulinresistens er et velkjent problem hos nyretransplanterte pasienter og kan defineres som svekket sensitivitet til insulins effekter på glukosemetabolismen. Behandling med immunsuppressive legemidler, kalsineurinhemmere og glukokortikoider har vist å øke risikoen for utvikling av insulinresistens, spesielt hvis pasienten lider av overvekt eller fedme [27]. *In vitro*- og biopsistudier i mennesker og i dyremodeller antyder at både CsA og Tac svekker β -cellefunksjonen i pankreas. Den eksakte mekanismen for dette er ikke fullstendig forstått, men kan inkludere ødeleggelse av β -cellene, avtagende insulinsyntese eller svekket insulinsekresjon [33]. Insulinresistens sees oftere ved bruk av Tac i forhold til CsA [34].

Behandling med glukokortikoider er assosiert med en økt risiko for diabetes mellitus, insulinresistens, hyperkolesterolemi og hypertensjon, alle uavhengige risikofaktorer for kardiovaskulær sykdom. Glukokortikoidene vil motvirke effekter av insulin, blant annet insulins effekt til å redusere appetitt, og vil derfor også kunne bidra til en eventuell vektøkning etter transplantasjonen. [35]. Vektøkning er vanlig etter en nyretransplantasjon, og er en viktig risikofaktor for svekket insulinsensitivitet og utvikling posttransplantasjondiabetes (PTDM) [36].

1.3.4 Overvekt og fedme

Fedme er en kronisk sykdom med en verdensomspennende prevalens som har økt i et alarmerende tempo i de siste tre tiårene [15]. Fedme er trolig den viktigste faktoren i det

metabolske syndromet og gir en økt risiko for kardiovaskulær sykdom i den generelle populasjonen [27]. WHO definerer overvekt som en BMI lik eller større enn 25, og fedme som BMI lik eller større enn 30. WHO's siste prosjektering i 2005 estimerte at over 1,6 billioner voksne er overvektige og minst 400 millioner lider av fedme globalt [37].

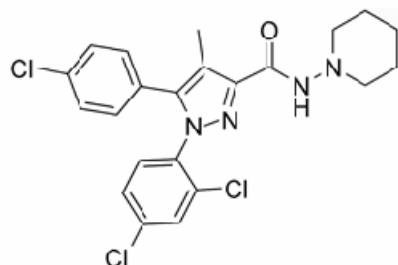
Overvekt og fedme har også blitt et problem i nyretransplanterte pasienter og bidrar på samme måte til moralitet og morbiditet i denne pasientpopulasjonen. Tall fra norsk nefrologiregister viser at ca. 20 % utvikler fedme ($BMI > 27$) etter transplantasjonen. Det er flere grunner til at mange nyretransplanterte opplever en vektøkning etter transplantasjonen [38]. Vanlige årsaker til vektøkning i den generelle populasjonen er multifaktoriell og kan for eksempel skyldes en stillesittende livsstil eller genetiske faktorer [39]. I tillegg til dette, vil nyretransplanterte også påvirkes av immunsuppressiv behandling med økt fettfordistribusjon og redusert fysisk aktivitet. Dessuten vil en følelse av velvære og glukokortikoidbehandling gi en økt appetitt, og også kunne bidra til en eventuell vektøkning [39, 40]. Fedme har en ugunstig effekt i den kliniske fremgangen etter en transplantasjon og er oftere assosiert med forsinket graftfunksjon ved transplantasjonstidspunktet, høyere innsidens av kardiovaskulære sykdommer og en lavere langtidspasient – og graftoverlevelse [38]. En svak reduisering av vekten på 5-10 % kan resultere i signifikante forbedringer i fedmerelaterte kardiovaskulære risikofaktorer som hypertensjon, hyperlipidemi og type 2 diabetes [15].

Det er en stor interesse rundt, og et behov for, en farmakologisk behandling av fedme, også hos nyretransplanterte pasienter. I Norge er tre legemidler med forskjellige virkningsmekanismer godkjent for fedmebehandling. Orlistat (Xenical®) og Sibutramin (Reductil®) har vært på det norske markedet i noen år, men begge legemidlene har en farmakokinetikk og bivirkningsprofil som er ugunstig for nyretransplanterte [29, 41]. Det seneste tilgjengelige preparatet på markedet i Norge for behandling av fedme er rimonabant (Acomplia®).

1.4 Rimonabant

Rimonabant (Acomplia®) ble for første gang karakterisert i 1994 [42], og legemidlet fikk markedsføringstillatelse i Europa i juni 2006 [43]. Rimonabant (Figur 3) er den første selektive cannabinoid 1-reseptorblokkeren og inhiberer de farmakologiske effektene av

cannabinoid-agonister både sentralt og perifert. Cannabinoidreseptorer og endocannabinoider omfattes i det endocannabinoid (EC) systemet, et intracellulært signaleringssystem som spiller en viktig rolle i å regulere kardiovaskulære risikofaktorer assosiert med overvekt og fedme [44].

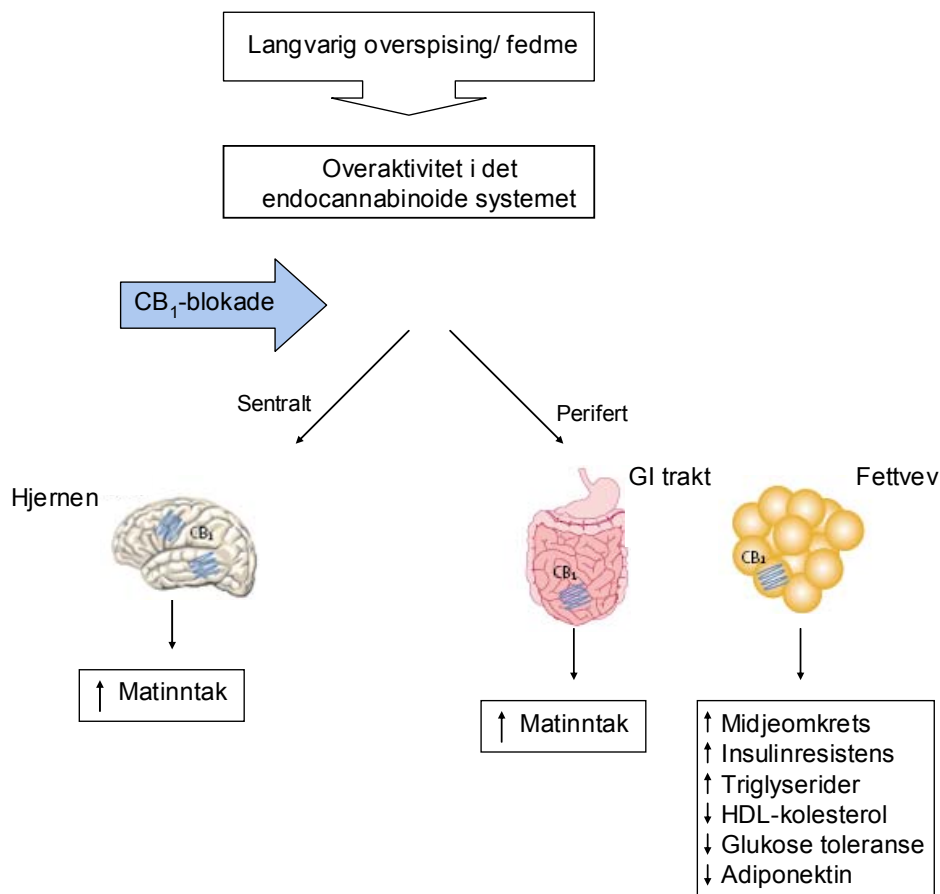


Figur 3: *Strukturen til rimonabant*

1.4.1 Det endocannabinoid system og rimonabant

Det endocannabinoid systemet er et fysiologisk system som finnes både i hjernen og i perifert vev. Systemet omfatter cannabinoidreseptorer, endocannabinoider og enzymer som inngår i syntesen og nedbrytningen av disse [44]. De endogene cannabinoidene, anandamid og 2-arakidoylglyserol, er endogene fosfolipidderivater som binder seg til og aktiverer cannabinoid reseptor type 1 (CB-1) og type 2 (CB-2) [42]. CB-1 reseptoren finnes i sentralnervesystemet og perifert finnes reseptorene i vev som bidrar til regulering av energibalansen, for eksempel gastrointestinaltraktus, lever, muskler og fettvev [44]. CB-2 reseptorer er særlig uttrykt i immunsystemet [45]. En rekke dyrestudier gir holdepunkt for at cannabinoidreseptorer er involvert i appetitt- og vektregulering. Endocannabinoidinjeksjon i det limbiske systemet hos rotter økte matinntaket, mens matinntaket avtok ved injeksjon av CB-1 blokker. Dette tyder på at cannabinoider bidrar til økt matinntak via påvirkning av energibalansen (hypothalamus) og belønningssystemet (det limbiske system) [44]. Noen studier har vist at overvektige dyr og mennesker har høyere nivåer av endocannabinoider enn normalvektige, en såkalt overaktivering i det endocannabinoid systemet. Ved tilstander som langvarig overspising og fedme vil EC systemet bli overaktivert, og dette har konsekvenser i flere fysiologiske og metabolske prosesser [46]. Et overaktivert EC system fremmer fettakkumulering, endrer fettvevets adiponektinproduksjon og kan promotere leversteatose gjennom økt hepatisk lipogenese. Sentral og perifer endocannabinoid

stimulering gir en anabol nettoeffekt med økt energiinntak, nedsatt energibruk og økt lagring av fett [44].



Figur 4: En hypotetisk modell for rollen av sentrale og perifere komponenter i det endocannabinoide systemet. Rimonabant blokkerer (vist ved stor blå pil) både sentrale og perifere effekter av CB-1 agonister [47].

Rimonabant blokkerer effektene av CB-1 agonister sentralt og perifert (Figur 4), men den komplette virkningsmekanismen til legemidlet er ikke fullstendig klarlagt. Fire randomiserte, dobbeltblinde, placebokontrollerte studier på rimonabant og overvekt er publisert [46-49]. Resultatene fra de kliniske studiene viser en større vektreduksjon av 5 mg og 20 mg rimonabant sammenliknet med placebo etter ett års behandling. To metaanalyser har funnet ut at rimonabant, sammen med en lavkalori diett, gir henholdsvis 4,7 kg og 4,9 kg større vektnedgang hos pasientene behandlet med 20 mg rimonabant sammenliknet med placebo. Det var også statistisk signifikant reduksjon i midjeomkrets, triglyseridverider og blodtrykk, økning av HDL-kolesterolnivå, redusert forekomst av metabolsk syndrom og reduserte glukose- og insulinnivåer sammenliknet med placebo [50, 51]. Studier i

dyremodeller har i tillegg kunne indikere en bedring i insulinsensitiviteten, uavhengig av vektreduksjon [52, 53].

1.4.2 Terapeutisk bruk

Indikasjonen for bruk av rimonabant er som tillegg til kostrestriksjon og mosjon ved fedme ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$) alene eller ved overvekt ($\text{BMI} > 27 \text{ kg/m}^2$) sammen med risikofaktorer for kardiovaskulære sykdommer som hypertensjon, type 2-diabetes eller dyslipidemi. Anbefalt dosering til voksne er 20 mg daglig [43].

Rimonabant, med sine vektreduserende egenskaper og antatt gode effekter på andre kardiovaskulære risikofaktorer, vil være et godt alternativ for overvektige nyretransplanterte for å hindre utvikling av kardiovaskulær sykdom, sett at det ikke oppstår en farmakokinetisk interaksjon mellom kalsineurinhemmerene og rimonabant.

1.4.3 Farmakokinetikk

Rimonabant blir raskt absorbert, og en maksimal plasmakonsentrasjon oppnås etter omtrent 2 timer [43, 54]. Steady-state blir nådd etter omtrent 13 dager [43, 54]. Tiden før steady-state oppnås varierer etter etnisitet og vekt. I japanske individer tar det kortere tid før steady-state oppnås (7 dager), og i pasienter som lider av fedme tar det lengre tid (25 dager) [54]. Det perifere distribusjonsvolumet til rimonabant ser altså ut til å være avhengig av pasientens vekt, slik at pasienter med fedme har et høyere distribusjonsvolum enn normalvektige [43]. Rimonabant har høy proteinbinding ($>99,9 \%$) i humant plasma, og viser førsteordenskinetikk over et vidt konsentrasjonsspektrum [55]. *In vitro* blir rimonabant metabolisert av CYP3A4 og amidohydrolase. De sirkulerende metabolittene har ingen aktivitet [43]. Rimonabant blir hovedsakelig eliminert ved metabolisme og en påfølgende galleekskresjon av metabolittene. Den gjennomsnittelige terminale halveringstiden til rimonabant er ca 10 dager i friske normalvektige, men er høyere i overvektige individer (16 dager). Clearance til legemidlet (CL/F) er omtrent 5 L/t [56].

Interaksjoner

Rimonabant blir hovedsakelig metabolisert av CYP3A4. Derfor vil en samtidig administrering av CYP3A4-hemmere kunne øke konsentrasjonen av rimonabant i blodet,

mens CYP3A4-indusere vil kunne redusere konsentrasjonen [55]. Rimonabant er ikke vist å inhibere eller indusere CYP enzymer eller P-gp *in vitro*. Dette ble klinisk bekreftet ved bruk av midazolam (et CYP3A4 substrat), warfarin (et CYP2C9 substrat) og digitoxin (et P-gp substrat) i spesifikke undersøkelsesstudier [56]. Siden både CsA og Tac blir metabolisert av det samme enzymet (CYP3A4), kan ikke en interaksjon med rimonabant fullstendig utelukkes, og ingen spesifikk farmakokinetisk interaksjonsstudie har hittil blitt utført for å undersøke denne mulige bilaterale interaksjonen. Tidligere *in vivo* og *in vitro* studier i friske frivillige, med relevante modellsubstrater for CYP-enzymmer, indikerer imidlertid at det ikke har oppstått noen relevant interaksjon [57, 58].

1.4.4 Bivirkninger

De vanligste bivirkningene av rimonabant er kvalme, humørsvingninger med depressive symptomer, depressive lidelser, angst og svimmelhet [43]. Europeiske legemiddelmyndigheter har innskjerpet bruksområdet for rimonabant, og preparatet er nå kontraindisert hos pasienter med alvorlig depresjon og hos pasienter som bruker antidepressive legemidler. Rimonabant er på overvåkningslisten til Statens legemiddelverk med tanke på psykiske symptomer og uventede kliniske effekter [59].

1.5 Mål med oppgaven

Overvekt og fedme er et stort problem i dagens samfunn, og har i de siste årene blitt et økende problem også hos nyretransplanterte pasienter. Fedme er trolig den viktigste faktoren i det metabolske syndromet og gir en økt risiko for kardiovaskulær sykdom. Kardiovaskulær sykdom er allerede den vanligste dødsårsaken hos nyretransplanterte, og det er derfor svært viktig å begrense risikofaktorer for kardiovaskulær morbiditet og mortalitet i denne pasientpopulasjonen. Rimonabant er et nytt legemiddel som ikke bare har vist vektreduserende egenskaper, men også gunstige effekter på andre kardiovaskulære risikofaktorer som blant annet insulinsensitivitet.

Nyretransplanterte blir behandlet med en livslang immunsuppresjonsterapi for å forhindre akutte reaksjon episoder. Kalsineurinhemmerene, CsA og Tac, utgjør grunnsteinene i den immunsuppressive behandlingen og begge legemidlene har et smalt terapeutisk vindu. Det er

derfor svært viktig å forsikre at nye legemidler, som skal brukes hos nyretransplanterte pasienter, ikke interagerer med verken CsA eller Tac. Selv om rimonabant blir metabolisert via det samme enzymet (CYP3A4) som kalsineurinhemmerene, har tidligere *in vivo* og *in vitro* studier ikke indikert noen relevant farmakokinetisk interaksjon mellom legemidlene.

Målet med denne oppgaven var å undersøke om det er trygt å administrere rimonabant til transplanterte pasienter som bruker henholdsvis CsA og Tac ved å utføre en 12 timers farmakokinetisk interaksjon undersøkelse. Det skulle også gjøres en initial undersøkelse på om insulinsensitiviteten ble forbedret, og om pasientene gikk ned i vekt etter en to måneders lang behandling med rimonabant.

2. Materiale og metoder

2.1 Pasienter

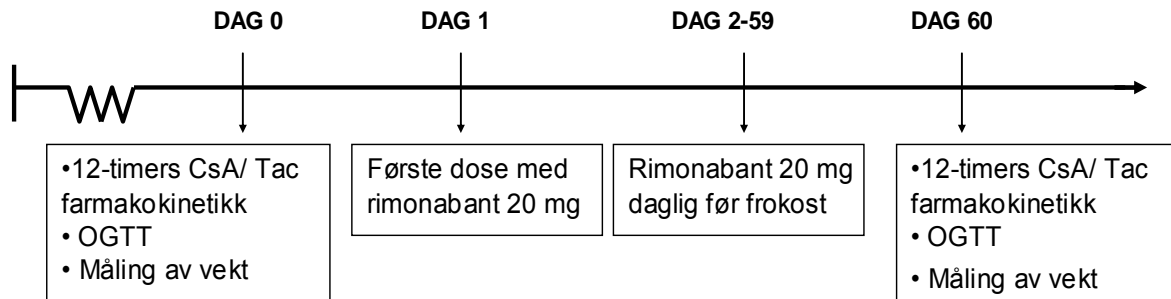
Studien inkluderte 18 nyretransplanterte pasienter (9 menn og 9 kvinner) med stabil nyrefunksjon i perioden august 2007 til april 2008. Pasientene som ble rekruttert brukte enten CsA (n = 10) eller Tac (n = 8) og steroidbasert immunsuppresjon (n = 17). 12 av de 18 pasientene brukte i tillegg MMF. Alle pasientene var over 18 år, og for å bli inkludert i studien måtte de ha en BMI > 30 kg/m² eller en BMI >27 kg/m² med en eller flere kardiovaskulære risikofaktorer. For fullstendige inklusjons- og eksklusjonskriterier se studieprotokoll vedlagt i appendiks.

Pasientene mottok skriftlig og muntlig informasjon om studien, og informert samtykke ble innhentet før undersøkelsene startet, i henhold til Helsinkideklarasjonen [60]. Pasientdata ble registrert i "Case Report Forms" (CRF), og all informasjon ble håndtert konfidensielt. Studien ble vurdert og godkjent av regional etisk komité, Statens Legemiddelverk, Datatilsynet og Sosial og Helse direktoratet.

2.2 Studiedesign

Studiedesignet er vist i Figur 5. Hver pasient møtte til to dager med prøvetaking. Til begge prøvetakingsdagene møtte pasientene fastende fra midnatt foregående kveld. Den første prøvetakingsdagen, dag 0, ble det utført "baseline" målinger. Dette inkluderte 12 timers farmakokinetikk undersøkelse, en oral glukose toleranse test (OGTT), vekt- og høydemålinger og standard hematologiprøver. Pasientene ble så behandlet med rimonabant (Acomplia®, Sanofi-Aventis) 20 mg en gang daglig fra morgenen etter og 2 måneder fremover for å oppnå "steady-state". Pasientene kom deretter tilbake, dag 60, og gjennomgikk de nøyaktig samme undersøkelsene som ved første prøvetakingsdag. Ved den første prøvetakingsdagen ble det i tillegg utført CYP og P-gp genotyping av pasientene. Av sikkerhetsmessige hensyn måtte alle pasientene ta blodprøver hos sin primærlege ca 2 og 5 uker etter oppstart av rimonabantbehandlingen for å monitorere CsA/Tac konsentrasjonen

ved måling av henholdsvis C_2 - og C_0 -verdier. Compliance for rimonabantbehandlingen ble kontrollert med tablett-telling ved siste prøvetakingsdag, i samsvar med studieprotokollen.



Figur 5: Studiedesign. Ved Dag 0 ble pasientenes 12-timers farmakokinetikkprofil for CsA/Tac bestemt. Fra dag 2 til 59 ble pasientene behandlet med rimonabant 20 mg daglig før frokost. På Dag 60 ble pasientenes 12-timers farmakokinetikkprofil for CsA/Tac bestemt igjen.

2.3 Farmakokinetikk undersøkelser

Pasientene møtte tidlig på prøvetakingsdagen og fikk umiddelbart lagt inn en venflon av en av bioingeniørene på nyrelaben. Det ble tatt blodprøver over 12 timer, i alt 12 ganger, med korte tidsrom fra morgenen av og lengre tidsintervaller utover dagen og kvelden (henholdsvis 0 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 3 – 4 – 6 – 8 – 10 og 12 timer etter inntak av CsA/Tac). Standard prosedyrer ble fulgt ved hver prøvetaking, og venflonen ble skylt med heparin etter hver gang for å hindre koagulering i denne. To timer etter administrasjon av CsA/Tac fikk pasientene en standard sykehusfrokost og tok resten av morgenmedisinene sine. Videre kunne pasientene spise normalt resten av dagen.

Til hvert prøvetakingstidspunkt ble det tatt et 4 mL heparin-rør for måling av CsA-konsentrasjon i fullblod eller et 4 mL EDTA-rør for måling av Tac-konsentrasjon i fullblod, avhengig av hvilket av de to legemidlene pasienten brukte. Disse prøvene ble så fordelt på to 1,8 mL nuncrør slik at det ble to paralleller for hver prøve, og de ble frosset ved -20°C . Før inntak av CsA/Tac ble det i tillegg tatt et 7 mL EDTA-rør av hver pasient. Dette røret ble frosset ved -20°C , og ble brukt til genotyping av *CYP3A5* og *MDR1*.

2.4 Oral glukose toleranse test

Metode

Oral glukose toleranse test, også kalt glukosebelastning, er en test for å undersøke kroppens evne til å omsette glukose, og blir målt ved å gi glukose oralt og deretter måle glukoseverdien i blodet. For bestemmelse av glukosetoleranse ble verdiene i Tabell 1 brukt [61, 62].

Tabell 1: WHO's kriterier for diagnose av glukosetoleranse og diabetes ved oral glukosetoleransetest (fullblod mmol/l) [61].

	Fastende verdi		2 timers verdi
Normal glukosetoleranse	< 5,6	og	< 6,7
Forhøyet fastende glukose	5,6 - 6,0		
Nedsatt glukosetoleranse	< 6,1	og	6,7 – 9,9
Diabetes	≥ 6,1	eller	≥ 10,0

Praktisk prosedyre

75 g glukose ble løst i 3 dl vann og denne løsningen ble inntatt oralt etter en natts faste. Blodglukoseverdiene ble målt i fullblod med et Hemocue AB glukoseapparat, Ängelholm, Sverige like før og 2 timer etter inntak av glukoseløsningen. Denne testen ble gjort parallelt med de farmakokinetiske undersøkelsene, det vil si at pasientene tok CsA eller Tac sammen med glukoseløsningen.

2.5 Analysemetoder for ciklosporin A og takrolimus

Konsentrasjonsbestemmelsen av CsA og metabolitter, samt Tac, i fullblod ble utført med validerte LC-MS/MS metoder [63] [64]. Lister over reagenser, løsninger og utstyr som ble brukt under utføringen av analysene er vedlagt i appendiks.

2.5.1 Konsentrasjonsbestemmelse av CsA og hovedmetabolitter

Fast-fase-ekstraksjon

Prøveopparbeidelse av fullblodprøvene ble utført før LC-MS/MS-analysen for å oppkonsentrere prøvene og for å fjerne stoffer som kunne ødelegge analyseapparatene samt interferere med bestemmelsen av analyttene.

Fullblodprøvene ble tint umiddelbart før prøveopparbeidelse. Det ble pipetert av 200 µL fullblod og tilsatt 50 µL ciklosporin C (CsC) 0,5 µg/mL i ACN/metanol/deionisert vann (20:20:60 v/v) som ble brukt som intern standard (I.S.). Det ble deretter tilsatt 500 µL metanol for å få felt proteinene. Blandingen ble vortexet og sentrifugert (12000 g, 30 min, 4 °C). Supernatanten ble deretter avpipetert, tilsatt 100 µL metanol og sentrifugert på nytt (12000 g, 15 min, 4 °C). Supernatantene ble så pipetert av for fast-fase-ekstraksjon.

Fast-fase-kolonnene (Water Oasis[®], HLB 1cc, 30 mg) ble først kondisjonert med 1 mL metanol etterfulgt av 1 mL deionisert vann. Supernatantene ble deretter applisert på kolonnen sammen med 500 µL deionisert vann. Det ble så vasket med 1 mL deionisert vann etterfulgt av 1 mL 65 % metanol (metanol/deionisert vann 65:35 v/v). Analyttene ble deretter eluert med 90 % metanol (metanol/deionisert vann 90:10 v/v), og samlet i glassrør. Undertrykk ble satt på mot slutten av elueringen for å sikre et høyt utbytte. Elueringsmidlet ble dampet av ved bruk av en Speedvac[®] (Thermo Electron Corporation SPD12IP). Inndampet eluat ble så løst i 250 µL av 65 % av mobilfase A og 35 % mobilfase B som tilsvarer startsammensetningen av mobilfasen i den kromatografiske gradienten. Løsningen ble deretter vortexet og pipetert over i injeksjonsglass til LC-MS/MS analyse.

LC-MS/MS analyse

Kromatografisk separasjon ble utført ved "high performance liquid chromatography" (HPLC). HPLC utstyret (ThermoFinnigan, Austin, Texas, USA) bestod av en Ultimate 3000 Autosampler og en Ultimate 3000 pumpe. Prøver på 250 µL ble plassert i autosampleren (8 °C), og 100 µL ble injisert. En omvendt-fase C₈-kolonne (BetaBasic-8, 30 x 2,1 med mer, 3 µm, Thermo Electron Corporation, CT, USA) koblet til en forkolonne (Drop-In Guard Cartridge, 10 x 2 med mer, 5 µm, Thermo Electron Corporation, CT, USA) ble benyttet til den kromatografiske separasjonen. Kolonnene ble varmet opp til 75 °C i en kolonneovn (Prominence Column Oven, CTD-20AC, Shamadzu). Mobilfasene som ble brukt bestod av

mobilfase A: acetonitril (ACN)/ 20 mM $\text{NH}_4^+\text{COO}^-$ (20:80 v/v) og mobilfase B: ACN/ 20 mM $\text{NH}_4^+\text{COO}^-$ (80:20 v/v). Begge mobilfasene var justert til pH 3,6 med maursyre. Mobilfasehastigheten var 0,2 mL/min. Analyttene ble eluert med gradient; fra 0 til 16 minutter ble det eluert med 65 % mobilfase A og 35 % mobilfase B. Fra 16 til 25 minutter økte mobilfase B lineært til 80 %. Ved 25 minutter gikk begge mobilfasene tilbake til utgangspunktet. Total analysetid var 30 minutter. I de første 4 minuttene og i de siste 30 sekundene gikk mobilfasene utenom detektoren.

Massespektrometrisk deteksjon ble utført av en Finnigan LOQ^{DUO} ionefelle MS-detektor (ThermoFinnigan, Austin, Texas, USA). Kjemisk ionisasjon ved atmosfæretrykk (APCI) ble benyttet som ioniseringsteknikk i overgangen fra HPLC til massespektrometret. MS-detektoren ble innstilt på ”multiple reaction monitoring” (MRM) hvor selekterte forløperioner ble kollidert og fragmentioner detektert. Fragmenteringsoverganger valgt ut i MRM er vist i Tabell 2.

Tabell 2: Fragmenteringsoverganger i MRM for ciklosporinanalysen

Struktur	m/z-verdi	m/z-verdi til fragmentene
CsA	1202,5	1185,3
AM19	1234,6	1132,5 - 1191,5 – 1217,5
AM1c9	1234,6	1190,6 - 1191,5
AM1	1218,5	1116,5 - 1201,5
AM9	1218,5	1116,5 - 1201,5
AM1c	1218,2	1106,0 - 1188,8
AM4N	1188,5	1171,5
CsC	1218,6	1201,5

Intervallet for måling av forløperionene ble satt til $m/z = 4,0$, mens intervallet for fragmentionene ble satt til $m/z = 3,2$. Dataprogrammet Xcalibur[®] (versjon 2.0) ble brukt til systemoperasjon og databehandling.

Standardkurver, kvalitetskontroll og konsentrasjonsbestemmelse

For analyse av fullblodprøvene ble det laget standarder fra 2,5 til 3000 ng/mL (2,5 – 5 – 10 – 25 – 50 – 100 – 250 – 500 – 1500 – 3000 ng/mL) for CsA og metabolittene AM1, AM9 og AM1c. For de resterende metabolittene, AM4N, AM19 og AM1c9, skulle det blitt laget standarder i det nederste konsentrasjonsområdet fra 2,5 til 500 ng/mL, men på grunn av mangel på referansesubstans ble ikke dette gjort. Det ble i stedet brukt den relative

konsentrasjonen (topphøyderatio mellom analytt og I.S.) og deretter korrigert med en faktor fra en tidligere standardkurve for å finne den eksakte konsentrasjonen. Tilfeldige kvalitetskontroll (QC)-prøver bestående av CsA og hver metabolitt ble også analysert. 5 % av prøvene som ble kjørt var QC-prøver. Enheter på 50 µL I.S. 0,5 µg/mL ble tilsatt både standarder og prøver. Lineær regresjon av topphøyderatio mellom analyttene og I.S. som funksjon av analyttkonsentrasjon genererte stigningstall og skjæringspunkt som ble brukt til utregning av ukjent analyttkonsentrasjon etter følgende formel:

$$x = (y-b)/a$$

hvor

- x = analyttkonsentrasjonen
- y = topphøyderatio mellom analytt og I.S
- b = standardkurvens skjæringspunkt med y-
- a = standardkurvens stigningstall

Den nedre kvantifiseringsgrensen for CsA var 0,25 ng/mL. AM9, AM19 og AM1c9 kunne kvantifiseres ned til 0,50 ng/mL, mens nedre kvantifiseringsgrense for AM1c, AM1 og AM4N var 1,0 ng/mL. Intra- og interdagpresisjonen for CsA ga henholdsvis variasjonskoeffisient (CV) < 15 % og CV <18 %. For metabolittene var både intra og interdag CV <20 %.

2.5.2 Konsentrasjonsbestemmelse av Tac

Analysen for konsentrasjonsbestemmelsen av Tac ble utført ved avdeling for Medisinsk Biokjemi på Rikshospitalet. Prøvene i EDTA-blod ble frosset ned ved -20 °C før prøveopparbeidelse og analyse ved LC-MS/MS. Prøveopparbeidelsen var basert på metoden beskrevet av Keevil et.al [65]. Pasientprøvene og standarder ble tilsatt 0,1 M sinksulfat, fulgt av I.S. (ACN (500 µL) med ascomycin (2 µg/L)). Prøvene ble deretter vortexet, sentrifugert og supernatanten injisert. Prøvene ble separert ved Waters 2795 Alliance® HPLC system og kolonnen var en Waters C18 3 µm 2,1 x 10 mm. Mobilfasene som ble brukt bestod av mobilfase A: vann med 2 mM ammoniumacetat og 0,1 % maursyre og mobilfase B: metanol med 2 mM ammoniumacetat og 0,1 % maursyre. Massespektrometrisk deteksjon ble utført av en Waters Quattro MicroTM API massespektrometer. Fragmenteringsoverganger valgt ut i MRM er vist i Tabell 3.

Tabell 3: Fragmenteringsoverganger i MRM for takrolimusanalysen

Struktur	m/z-verdi	m/z-verdi til fragmentene
Takrolimus	821,5	768,5
Intern standard (ascomycin)	809,5	756,5

Ved den nedre kvantifiseringsgrensen, 0,5 µg/L, var inter- og intradag nøyaktighet og presisjon, henholdsvis 99,4 og 97,7 % og 14,7 og 12,85 %. Ved den øvre kvantifiseringsgrensen, 50 µg/mL, var inter- og intradag nøyaktighet og presisjon henholdsvis 99,4 og 97,7 % og 2,9 og 2,7 %.

2.5.3 Beregning av farmakokinetiske parametere

AUC₀₋₁₂ ble beregnet ved bruk av trapesmetoden. Eliminasjonskonstanten (k_{el}) ble beregnet ved å estimere stigningstallet i et semi-logaritmisk plott på konsentrasjon-tids kurven i eliminasjonsfasen. Noen av pasientenes grafer viste et spesielt kurveforløp, og fra disse grafene ble k_{el} beregnet ved å ekskludere et eller to av de siste punktene på grafen, avhengig av grafens utseende. CL/F er beregnet som dose/AUC og $T_{1/2}$ som $\ln 2 / k_{el}$. Den maksimale konsentrasjonen (C_{max}) og tiden til C_{max} (T_{max}) er faktiske observerte verdier. Hos en av pasientene ble det kun utført 8 timers farmakokinetikk undersøkelser. For å kunne inkludere denne pasienten i analysene måtte verdiene oppnådd fra 8 timers farmakokinetikken ekstrapoleres til 12 timer, slik at denne pasienten kunne sammenlignes med de øvrige pasientene.

2.5.4 Statistisk analyse

De ulike variablene ble først testet for normalfordeling for å kunne velge riktig statistisk analyse til datamengden. Dataene ble så ln transformert og testet for normalfordeling på nytt. Ulike statistiske analyser ble deretter utført for å indikere om det var signifikante demografiske og/eller farmakokinetiske forskjeller etter behandling med rimonabant. Avhengig av om dataene var normalfordelte, ble det benyttet enten en paret t-test eller en Wilcoxon test for par sammenligning for å evaluere effekten av rimonabantbehandlingen. Det ble betraktet som en statistisk signifikant forskjell ved p-verdier $< 0,05$. Programmet SPSS for Windows versjon 15 ble brukt til å utføre de statistiske analysene.

En bioekvivalensanalyse ble utført for å avgjøre om det har inntruffet en interaksjon mellom CsA/Tac og rimonabant ved å bestemme forskjeller i de farmakokinetiske parameterne AUC_{0-12} og C_{max} , i henhold til EMEAs retningslinjer for bioekvivalensstudier [66]. AUC_{0-12} og C_{max} fra behandling uten rimonabant ble satt som referanse, mens AUC_{0-12} og C_{max} fra behandling med rimonabant ble satt som test. Alle disse verdiene ble ln-transformert for å få de normalfordelte. For å vise bioekvivalens måtte et 90 % konfidensintervall av forholdet mellom test og referanse ligge innenfor et intervall mellom 0,80-1,25.

Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm standardavvik dersom ikke annet er oppgitt.

3. Resultater

3.1 Pasientene

Totalt ble det inkludert 18 pasienter, 17 av disse fullførte studien. Den ene pasienten som ikke fullførte studien ble ekskludert fra studien etter fire uker på grunn av trolige bivirkninger av rimonabant. Hos en av pasientene ble det kun utført 8-timers kinetikk, da pasienten måtte gå før 12 timer på grunn av personlige årsaker. En av pasientene som ble inkludert i studien hadde diabetes. Dette medførte at pasienten ikke utførte glukosebelastningen, men ble kun med i de farmakokinetiske undersøkelsene. Denne pasienten ble kun behandlet med rimonabant i fem uker, mens alle de andre pasientene som fullførte ble behandlet i to måneder. En oversikt over sentrale demografiske parametere ved baseline er oppsummert i Tabell 3a. Tabell 3b viser sentrale demografiske data før og etter rimonabantbehandling for CsA og Tac pasientene samlet. Det var ingen forskjeller i de demografiske dataene mellom pasienter behandlet med CsA og pasienter behandlet med Tac. Dette er presentert i appendiks hvor de demografiske dataene for CsA-pasientene og Tac-pasientene er fremstilt separat.

Tabell 3a: Demografiske parametere for pasientene inkludert i studien. Tallene er oppgitt som gjennomsnittsverdier \pm standardavvik eller antall pasienter dersom ikke annet er oppgitt.

Demografiske parametere	CsA	Tac	Total
Alder (år)	54 \pm 10	48 \pm 11	51 \pm 11
Kjønn (mann/kvinne)	5/5	4/4	9/9
År siden Tx (median, spredning)	5,3 [2,9-21,7]	6,0 [0,9-13,4]	5,6 [0,9-21,7]
Donor (levende/avdød)	2/8	4/4	6/12
Døgndose CsA (mg/dag)	200 \pm 48		
Døgndose Tac (mg/dag)		5,6 \pm 2,4	
Døgndose prednisolon (mg/dag) ¹	5 \pm 0	5,4 \pm 0,9	5,1 \pm 0,6
MMF (ja/nei)	8/2	4/4	12/6
Forkortelser:	Anmerkninger:		
MMF = mykofenolat mofetil	¹ En pasient fikk ikke prednisolon		

Tabell 3b: Demografiske parametere for både CsA og Tac pasientene før og etter rimonabantbehandlingen. Tallene er oppgitt som gjennomsnittsverdier \pm standardavvik eller antall pasienter dersom ikke annet er oppgitt.

	CsA/Tac alene	CsA/Tac + rimonabant	P-verdi
Vekt (kg)	96,5 \pm 15,2	94,5 \pm 15,2 ³	0,001
BMI (kg/m ²)	32,6 \pm 3,9	32,0 \pm 3,9 ³	0,001
Blodprøvesvar			
P-Kreatinin (μ mol/L)	112 \pm 36	116 \pm 41 ³	0,306
P-Urea (mmol/L)	10,1 \pm 4,7 ³	9,5 \pm 4,9 ³	0,519
GFR, estimert (mL/min) ¹	79 \pm 19	78 \pm 20 ³	0,311
P-Total kolesterol (mmol/L)	5,2 \pm 1,0	4,9 \pm 1,0 ³	0,049
P-HDL-kolesterol (mmol/L)	1,5 \pm 0,6	1,4 \pm 0,6 ³	0,659
P-LDL-kolesterol (mmol/L)	3,1 \pm 0,9	2,9 \pm 0,7 ³	0,061
P-Triglyserider (mmol/L)	2,4 \pm 1,8 ⁴	1,6 \pm 0,73 ⁵	0,076
Forkortelser:		Anmerkninger:	
P = i plasma		¹ Estimert fra Nankivells formel [67]	
BMI = body mass index		³ Utført på 17 pasienter	
GFR = glomerulær filtrasjonsrate		⁴ Utført på 15 pasienter	
HDL = high density lipoproteins		⁵ Utført på 16 pasienter	
LDL = low density lipoproteins			
MMF = mycofenolat mofetil			
Tx = transplantasjon			

Døgndosene av CsA/Tac og prednisolon ble holdt konstant hos pasientene i løpet av de to månedene de var inkludert i studien. Rimonabantbehandlingen reduserte vekt, BMI og totalkolesterol signifikant (Tabell 4). Pasientenes vekt ble redusert med $2,1 \pm 0$ %, BMI ble redusert med $1,8 \pm 0$ % og totalkolesterol viste en nedgang på $5,8 \pm 0$ %. LDL-kolesterol og triglyserider tenderte også å bli redusert, mens HDL-kolesterol ikke viste noen signifikant forskjell. Nyrefunksjonen til pasientene, representert ved kreatinin- og ureaverdier og estimert GFR, viste ingen signifikant forskjell under rimonabantbehandlingen.

3.1.1 Bivirkninger

Tre av de 18 pasientene inkludert i studien opplevde alvorlige bivirkninger som ikke kunne utelukkes å være forårsaket av rimonabant. To av pasientene fikk depresjoner, mens en pasient hadde voldsomme mareritt nesten hver natt. Den ene pasienten med depresjon ble

ekskludert fra studien før andre undersøkelsesdag, mens de to andre pasientene ikke rapporterte om de opplevde bivirkningene før på den siste undersøkelsesdagen. Syv av pasientene rapporterte ingen bivirkninger. To av de øvrige pasientene opplevde overgående søvnforstyrrelser ved oppstart av rimonabantbehandlingen, men hadde ellers ingen bivirkninger. Tabell 4 viser en oppsummering av bivirkningene og insidensen av disse, blant de 18 pasientene som var inkludert i studien.

Tabell 4: Bivirkninger og insidensen av disse hos pasientene inkludert i studien. Tallene er oppgitt som antall pasienter.

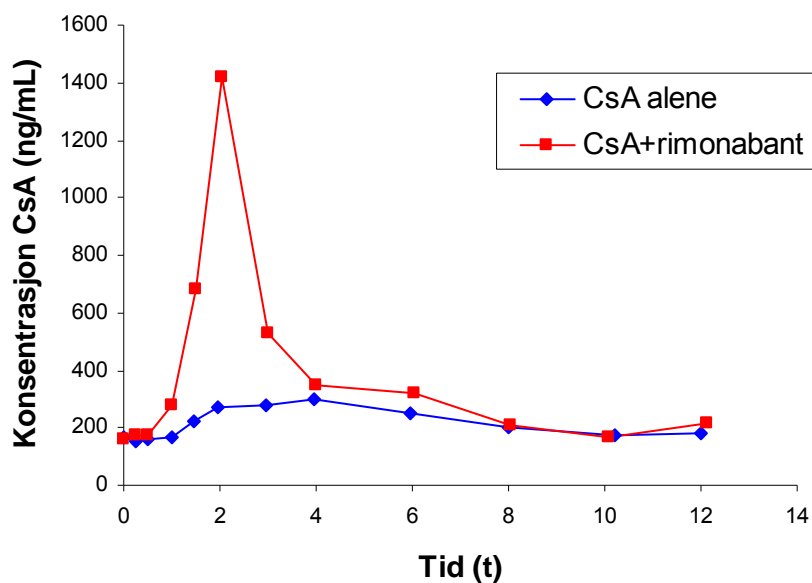
Bivirkninger	
Depresjon	2/18
Søvnforstyrrelser (mareritt)	1/18
Urolig mage	4/18
Svimmelhet	2/18
Sukkerhunger	2/18

3.1.2 Compliance

Det ble utført tablett-telling ved siste prøvetakingsdag. Alle pasientene utviste en god compliance. 12 av de 17 pasientene som fullførte studien hadde tatt alle tablettene og utviste dermed 100 % compliance. En av pasientene hadde glemt å ta fem tabletter, dette var imidlertid helt i begynnelsen av rimonabantbehandlingen, og en annen pasient hadde unnlatt å ta tre tabletter på grunn av sykdom. De resterende pasientene hadde kun glemt en til to tabletter i løpet av den to måneders lange rimonabantbehandlingen.

3.2 Ciklosporin A farmakokinetikk

Kun seks av de 10 CsA-pasientene ble analysert på grunn av svikt i analyseapparatet. Figur 6 viser fullblodkonsentrasjon av CsA versus tidskurven for en av pasientene som var inkludert i studien. Pasienten utviser en svært ukarakteristisk farmakokinetikk ved baseline undersøkelsen (CsA alene). Denne pasienten ble ekskludert fra analysene.



Figur 6: Fullblodkonsentrasjon av CsA versus tidskurven for en av pasientene inkludert i studien. Pasienten utviser en svært atypisk farmakokinetikk ved behandling med CsA alene.

De farmakokinetiske analysene for CsA inkluderer derfor gjennomsnittsverdier for kun fem pasienter. Tabell 5 viser sentrale farmakokinetiske parametere for de fem pasientene både før og etter rimonabantbehandling. AUC_{0-12} , C_{max} , C_0 , og CL/F viser alle en signifikant forskjell etter behandling rimonabant. Gjennomsnittlig AUC_{0-12} for CsA økte med $23 \pm 56 \%$ ($p = 0,043$). Også gjennomsnittlig C_{max} for CsA økte med $32 \pm 280 \%$ ($p = 0,043$). C_0 - og C_2 -verdiene øker, mens CL/F og $T_{1/2}$ reduseres. Bioekvivalenskriteriene er ikke oppfylt, da den øvre delen av konfidensintervallet for både AUC_{0-12} (1,33) og C_{max} (1,56) ligger utenfor den øvre referanseverdien (1,25). Figur 7 viser den gjennomsnittlige fullblodkonsentrasjon versus tidskurven for CsA før og etter rimonabantbehandling.

Tabell 5: Sentrale farmakokinetiske parametere for CsA før og etter behandling med 20 mg rimonabant. Alle variablene ble ln transformert før bioekvivalensanalysen og ble deretter analysert med Wilcoxon's test for parsammenligning.

	CsA alene n = 5	CsA + rimonabant n = 5	p-verdi	90 % KI av ratio ¹
AUC ₀₋₁₂ (ng t/ mL)	3220 ± 181	3948 ± 283	0,043	1,13 – 1,33
C _{max} (ng t/ mL)	671 ± 66	884 ± 251	0,043	1,06 – 1,56
C ₂ (ng t/ mL)	671 ± 66	884 ± 251	0,138	1,11 – 2,39
C ₀ (ng t/ mL)	178 ± 21	189 ± 27	0,043	0,98 – 1,14
CL/F (L/t)	31,2 ± 6,5	25,5 ± 4,6	0,043	0,75 – 0,89
T _{1/2} (t)	15,2 ± 12,2	11,9 ± 4,5	0,686	0,58 – 1,52
T _{max} (t)	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	0,715	1,01 – 1,05

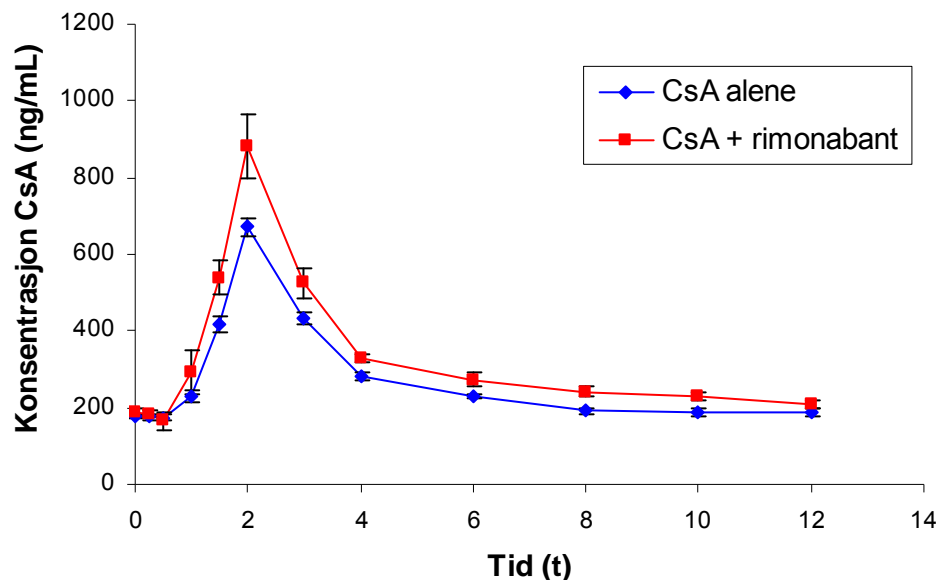
Forkortelser:

AUC = arealet under konsentrasjonskurven

CL = clearance

C_{max} = maksimal konsentrasjonC₀ = konsentrasjon før doseC₂ = konsentrasjon 2 timer etter dose

F = biotilgjengelighet

T_{1/2} = halveringstidT_{max} = tiden fra inntak av legemiddel til C_{max}**Anmerkninger:**¹Ratio = Tac + rimonabant/ Tac

Figur 7: Fullblodkonsentrasjon av CsA versus tidskurven uten og med rimonabantbehandling. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± SEM

Inkludering av den atypiske pasienten i analysen påvirket ikke det totale bildet.

Farmakokinetiske parametere inkludert denne pasienten er presentert i appendiks.

3.3 Takrolimus farmakokinetikk

Tabell 6 viser sentrale farmakokinetiske parametere for Tac både før og etter behandling med 20 mg rimonabant daglig. Rimonabant induserte ingen signifikante forandringer. C_{\max} viste imidlertid relativt stor variasjon etter rimonabantbehandling og en 17 ± 48 % økning medførte at bioekvivalenskriteriene ikke ble fullstendig oppfylt. Den øvre delen av konfidensintervallet for C_{\max} (1,37) ligger rett utenfor referanseområdet (1,25) (Tabell 6). Den gjennomsnittelige fullblodkonsentrasjon versus tidskurven for Tac før og etter rimonabantbehandling er vist i Figur 8.

Tabell 6: Sentrale farmakokinetiske parametere for Tac før og etter behandling med 20 mg rimonabant. Alle variablene, bortsett fra T_{\max} , ble ln transformert før statistisk analyse med en parett t-test. T_{\max} ble analysert med Wilcoxon's test for par sammenligning.

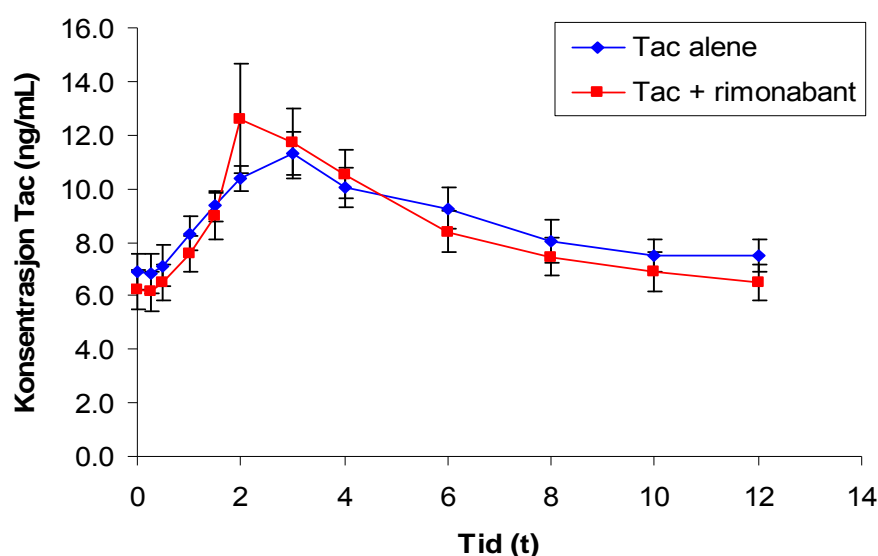
	Tac alene n = 8	Tac + rimonabant n = 8	p-verdi	90 % KI av ratio ¹
AUC ₀₋₁₂ (ng t/mL)	104 ± 24	101 ± 29	0,445	0,87 – 1,05
C_{\max} (ng/mL)	11,7 ± 2,1	13,7 ± 5,2	0,392	0,91 – 1,37
C_0 (ng t/mL)	6,9 ± 2,0	6,2 ± 2,2	0,106	0,86 – 1,23
CL/F (L/t)	28,9 ± 15,5	28,9 ± 11,4	0,493	0,95 – 1,14
$T_{1/2}$ (t)	12,5 ± 4,0	11,5 ± 3,9	0,506	0,77 – 1,11
T_{\max} (t)	3,0 ± 1,4	2,4 ± 0,9	0,612	0,18 – 0,70

Forkortelser:

Se tabell 5

Anmerkninger:

¹Ratio = Tac + rimonabant/ Tac



Figur 8: Fullblodkonsentrasjon av Tac versus tidskurven uten og med rimonabantbehandling. Dataene er presentert som gjennomsnitt ± SEM

3.4 Oral glukose toleranse test

Oral glukosebelastning ble utført på alle pasientene, bortsett fra hos pasienten som hadde diabetes, på begge undersøkelsesdagene. Ved andre undersøkelsesdag måtte to av pasientene avbryte undersøkelsen på grunn av kvalme og oppkast etter å ha drukket glukoseløsningen, og fullstendige data ble derfor kun oppnådd for 15 pasienter. Fastende blodglukose tenderte å øke fra $5,3 \pm 0,7$ til $5,6 \pm 0,5$ mmol/l ($p = 0,059$), mens 2-timers verdiene tenderte å bli redusert fra $6,5 \pm 1,6$ til $6,1 \pm 1,3$ etter rimonabantbehandlingen ($p = 0,052$). Ved den første undersøkelsesdagen var syv av de 18 pasientene karakterisert med en nedsatt glukosetoleranse og tre pasienter hadde en forhøyet fastende blodglukose. Etter den to måneders lange behandlingen med rimonabant hadde glukosetoleransestatusen til pasientene ikke endret seg, bortsett fra hos en av pasientene som gikk fra en nedsatt glukosetoleranse til en normal glukosetoleranse etter behandling med rimonabant.

3.5 Genotyping av CYP og P-gp

Genotyping av pasientene ble ikke utført på grunn av tekniske problemer, men blodprøver fra alle pasientene er samlet inn.

4. Diskusjon

Hovedfunnene i denne studien var at en to måneder lang rimonabantbehandling i stabile nyretransplanterte pasienter viste en moderat, men signifikant økning i den systemiske eksponeringen av CsA, mens farmakokinetikken til Tac ikke ble påvirket i noen relevant grad. Nyrefunksjonen til pasientene holdt seg stabil og det ble vist en signifikant nedgang i vekt/BMI etter behandling med rimonabant. Insulinsensitiviteten viste derimot ingen forbedring etter to måneders rimonabantbehandling.

4.1 Farmakokinetisk interaksjonsundersøkelse

De foreløpige resultatene fra studien viste en signifikant økning i CsA-konsentrasjonen ved samtidig administrering av rimonabant. Det ble analysert for få pasienter til å kunne trekke sikre konklusjoner, men de foreløpige resultatene indikerer en tendens til økt konsentrasjon av CsA etter rimonabantbehandling. For endelig konklusjon om denne potensielle økningen må de tre siste pasientene også analyseres. Denne økningen i AUC for CsA som følge av rimonabantbehandling har så vidt vi vet ikke blitt rapportert tidligere, og er av et omfang som det bør tas hensyn til i klinikken.

Tac oppfyller bioekvivalenskriteriene bortsett fra for C_{\max} , der det 90 % konfidensintervallet så vidt krysser den øvre referansegrensen på 1,25. Hos en av de åtte Tac-pasientene ble det observert en relativt høy C_{\max} verdi etter behandling med rimonabant. Det er vanskelig å si om dette skyldes rimonabantbehandlingen eller kun tilfeldig variasjon. Ingen av de andre Tac-pasientene viser den samme tendensen, og resultatene våre viste ingen signifikant forskjell i C_{\max} etter rimonabantbehandlingen. Det tyder på denne økningen i C_{\max} kun gjaldt for denne ene pasienten, og trolig ville en inkludering av flere pasienter medført at bioekvivalenskriteriene hadde blitt oppfylt for Tac ved en samtidig administrering av rimonabant.

Det er primært CYP3A4 som står for metabolismen av CsA og Tac [20, 21]. Rimonabant blir også metabolisert av CYP3A4, men er ikke vist å inhibere eller indusere CYP enzymer *in vitro* [56]. Forsøk utført med humane lever mikrosomer *in vitro* for å undersøke rimonabants potensial for å hemme CYP enzymer har viser at rimonabant hemmet CYP3A4,

men den beregnede enzyminhibering var 0,2 % eller mindre ved kliniske konsentrasjoner [57]. Det ble derfor konkludert med at det ikke forventes en klinisk metabolisme-basert interaksjon mellom rimonabant og samtidig administrerte legemidler på grunn av en inhibering av CYP enzymer. Dette ble bekreftet av en interaksjonsstudie mellom rimonabant og midazolam, et sensitivt og spesifikt modells substrat for CYP3A aktivitet. Studien inkluderte 37 friske individer, og viste at samtidig administrering av rimonabant og midazolam er godt tolerert [58]. Det er derfor lite trolig at tendensen til en økning i AUC som er observert for CsA kan ha oppstått på grunn av en inhibering av CYP3A. Siden også Tac i hovedsak metaboliseres av CYP3A4, ville en inhibering av dette enzymet trolig også gitt en endring i den systemiske eksponeringen av Tac. Dette ble ikke funnet i vår studie.

CsA er et kjent substrat for og en hemmer av P-gp [16]. En tendens til en økt CsA konsentrasjon kunne i teorien skyldes at rimonabant hemmet aktiviteten av P-gp. En hemming av P-gp aktiviteten vil føre til en økt absorpsjon og/eller redusert eliminasjon og dermed en økt systemisk eksponering av CsA. Det var ikke forventet at rimonabant skulle påvirke P-gp-aktiviteten, da studier har vist at rimonabant ikke hadde en innvirkning på farmakokinetikken til digoxin [68], som er et veletablert modells substrat for å bestemme aktivitet av P-gp *in vivo* [69]. Tac er på samme måte som CsA et substrat for og en hemmer av P-gp [16]. Det ville derfor etter all sannsynlighet også gitt et utslag på farmakokinetikkprofilen til Tac dersom rimonabant hadde påvirket P-gp aktiviteten.

En av forskjellene mellom CsA og Tac er i hvilken grad de binder seg til lipoproteiner i plasma. CsA er i høy grad bundet til lipoproteiner [70], mens Tac er primært bundet til α_1 -surt glykoprotein [3], og denne forskjellen kunne tenkes å være en årsak til at det er CsA som i størst grad blir påvirket av rimonabantbehandlingen. Resultater fra studien vår viste en nedgang i både total kolesterol og LDL-nivåer. Studier har vist at når lipidnivåer reduseres vil den frie fraksjonen av CsA øke, og siden CsA er et indermediært til lav ekstrahert legemiddel i leveren vil CL av CsA øke [71]. Dette er ikke med på å forklare funnet i vår studie, da en økt CL av CsA vil føre til en lavere eksponering og ikke en høyere eksponering av CsA slik resultatene våre viser en tendens til.

En ensidig økt systemisk eksponering av CsA kan på den andre siden skyldes at biotilgjengeligheten til CsA har økt uten at Tac er blitt påvirket i samme grad. En annen forskjell mellom CsA og Tac er at CsA i større grad er avhengig av gallesyre for å bli

absorbert. Det kunne derfor i teorien vært en mulighet for at mer CsA blir absorbert som en følge av en eventuell forandring i gallesyreutskillelsen under rimonabantbehandlingen. Siden gallesyre er sentral i nedbrytningen av fett og i omsetningen av kolesterol ville det ikke vært utenkelig at rimonabant med sine lipidsenkende egenskaper kunne påvirket gallesyreutskillelsen på en eller annen måte. Det er imidlertid ikke, etter vår kjennskap, rapportert om at rimonabant påvirker gallesyren, så denne teorien er kun spekulativ og kan sannsynligvis ikke alene forklare tendensen til den økte eksponeringen av CsA som er observert i vår studie. Det er i det hele tatt usikkert hvorfor det observeres en økt eksponering av CsA etter rimonabantbehandlingen, og de siste analysene må ferdigstilles før en kan konkludere med større grad av sikkerhet hva dette skyldes.

4.2 Insulinsensitivitet

De fire randomiserte, dobbelblinde, placebokontrollerte studiene på rimonabant og overvekt som er publisert viser alle en forbedring av glukosetoleranse og insulinsensitivitet etter ett års behandling med 20 mg rimonabant daglig [46-49]. I to av disse studiene ble det undersøkt, med en oral glukosebelastning, om rimonabant forbedret glukosetoleransen i overvektige ikke-diabetiske pasienter [46, 47]. Etter ett års behandling med rimonabant viste data fra studiene at rimonabant 20 mg daglig ga en signifikant større reduksjon i plasmaglukose og insulinverdier to timer etter inntatt glukoseløsning, sammenlignet med placebo. Dataene fra studiene viste også at rimonabant signifikant forbedret distribusjonen av glukosetoleransestatusen til pasientene, med en økende andel av pasienter med normal glukosetoleranse og en redusert andel av pasienter med nedsatt glukosetoleranse [72].

Resultatene våre, oppnådd fra den orale glukosebelastningen, viste ingen signifikant endring i verken fastende- eller 2-timers blodglukoseverdi, men det ble vist en svak tendens til at 2-timers verdien ble redusert etter rimonabantbehandlingen. Glukosetoleransestatusen til noen av pasientene forbedret seg imidlertid etter behandling med rimonabant. Det ble ikke utført insulinanalyser i vår studie. En insulinanalyse ville muligens bidratt til en bedre total oversikt over en eventuell endring i insulinsensitiviteten, og gitt en sterkere indikasjon om det var en trend til en forbedret insulinsensitivitet etter to timer.

De fire store studiene utført på rimonabant viste alle en signifikant nedgang i triglyserider og en signifikant økning av HDL-kolesterol [46-49]. Det var derfor forventet en endring i disse

variablene. Resultatene fra vår studie støtter opp under disse tidligere funnene og viste at totalkolesterol ble signifikant redusert etter rimonabantbehandling hos pasientene i studien. LDL-kolesterol og triglyserider viste en tendens til å bli redusert, mens HDL-kolesterol ikke endret seg signifikant etter rimonabantbehandlingen.

Det er trolig at en behandlingsperiode med rimonabant på kun to måneder er en for kort periode til å kunne betydelige forandringer i både insulinsensitiviteten og i lipidprofilen til pasientene. Tre av de fire RIO-studiene konkluderer med at de observerte forbedringene i insulinsensitiviteten, HDL-kolesterol og triglyseridene er uavhengig av vekttapet [46] [47, 48], i samsvar med tidligere utførte dyrestudier [52]. En reduksjon av hyperinsulinemi forklares med at rimonabant ser ut til å ha direkte metabolske effekter som blant annet å øke sekresjonen av adiponektin ved å øke mRNA ekspresjonen av dette adipokinet [47, 48, 52]. Adiponektin blir utskilt fra fettcellene, og har blitt rapportert å ta del i reguleringen av hyperglykemi, hyperinsulinemi og fettsyreoksidasjon [47, 73]. En blokada av CB1-reseptorer kan også hemme hepatisk fettsyresyntese og hepatisk lipidakkumulering som også har blitt antydnet i insulinresistens og dyslipidemi [74].

4.3 Vektreduksjon av rimonabant

Det ble funnet en signifikant reduksjon både av vekt/BMI hos pasientene etter behandling med rimonabant. Vektnedgangen varierte betydelig mellom de ulike pasientene. Det var ikke forventet en stor vektnedgang for pasientgruppen siden behandlingsperioden med rimonabant kun varte i to måneder, og det faktum at pasientene ikke ble spesielt fulgt opp med kostveiledning eller andre vektregulerende tiltak. To metaanalyser utført på studiene om rimonabant og overvekt fant at rimonabant ga et vekttap på henholdsvis 4,7 kg og 4,9 kg etter ett års behandling med rimonabant i kostregulerte pasienter [50, 51]. Pasientene inkludert i vår studie hadde en gjennomsnittlig vekttap på 2,0 kg og det var ikke lagt noen føringer for matinntak eller fysisk aktivitet. Dette resultatet kan tyde på at rimonabant er et effektivt vektreduserende legemiddel, men to måneders behandling med rimonabant er en altfor kort periode til å kunne si med sikkerhet at vekttapet kun skyldes rimonabant. Det er i tillegg viktig at en vektreduksjon opprettholdes over tid, noe denne studien selvfølgelig ikke kan avdekke.

4.4 Bivirkninger og sikkerhetsparametere

Tre av de 18 inkluderte pasientene rapporterte om opplevde alvorlige bivirkninger som ikke kan utelukkes å være forårsaket av rimonabant. To av pasientene opplevde depresjoner, mens en pasient hadde store søvnforstyrrelser i utslag av mareritt. Både depresjoner og søvnforstyrrelser er kjente og vanlige bivirkninger av rimonabant [43]. Tre av de fire store kliniske studiene konkluderer med at rimonabant er godt tolerert, og at bivirkningene er milde og forbigående [47-49]. Alle bivirkningene rapportert i vår studie var også forbigående etter seponering av rimonabant. En av metaanalysene rapporterer imidlertid at rimonabantbehandling førte til signifikant flere bivirkninger enn placebo, og 1,4 ganger flere alvorlige bivirkninger. Metaanalysen beskriver videre at rimonabantbehandlede pasienter hadde en 2,5 ganger større sjanse for å bli ekskludert fra studien, som følge av depressive lidelser og humørsvingninger med depressive symptomer, enn de som fikk placebo [50]. Andre rapporterte bivirkninger fra studien vår inkluderte svimmelhet og GI-bivirkninger som urolig mage. Disse bivirkningene blir karakterisert som vanlige bivirkninger av rimonabant [43]. To av pasientene rapporterte om et økt sukkerhunger under behandling med rimonabant. Dette har, etter vår erfaring, ikke blitt rapportert tidligere.

Pasientenes nyrefunksjon ser ikke ut til å ha blitt påvirket i vesentlig grad av rimonabantbehandlingen. Både kreatininverdier og estimert GFR holdt seg relativt konstant i løpet av den to måneders lange rimonabantbehandlingen. Det er ingen sammenlignende data tilgjengelig siden ingen tidligere studier har undersøkt denne pasientpopulasjonen, men nyrefunksjonen er, så vidt vi vet, ikke blitt påvirket i studier på andre pasientpopulasjoner.

Det er for få pasienter inkludert i studien over en for kort periode til å kunne se noen klare og betydelige endringer i risikofaktorer som insulinsensitivitet og vektreduksjon. Studien vår har likevel gitt en indikasjon på en forbedring i risikofaktorer som blant annet vektreduksjon og forbedring av lipidprofilen. Den farmakokinetiske interaksjonsundersøkelsen indikerer at det vil være trygt å administrere rimonabant til Tac-pasienter, men den potensielle økningen i den systemiske eksponeringen av CsA må bekreftes eller avkreftes ved analysering av de tre siste pasientene før en endelig beslutning kan tas. Skulle det vise seg at det er en signifikant forskjell i AUC for CsA er dette av klinisk betydning, da CsA har et smalt terapeutisk vindu og konsentrasjoner utenfor dette vil kunne gi toksiske bivirkninger. Det

bør uansett gjøres en grundig nytte-risikovurdering og en kartlegging av pasientens psykiske tilstand før en eventuell behandling med rimonabant startes.

5. Konklusjon

En to måneders lang rimonabantbehandling i stabile nyretransplanterte pasienter viste en moderat, men signifikant økning i den systemiske eksponeringen av CsA. Farmakokinetikken til Tac endret seg ikke i noen relevant grad, og nyrefunksjonen til pasientene holdt seg stabil under rimonabantbehandlingen. Dette indikerer at det vil være trygt å administrere rimonabant samtidig med Tac i nyretransplanterte pasienter, mens de siste tre CsA-pasientene må analyseres for å kunne ta en endelig beslutning angående den potensielle påvirkningen av rimonabant på farmakokinetikken til CsA. Skulle det vise seg at forskjellene i den systemiske eksponeringen av CsA er signifikante selv etter at de tre siste pasientene har blitt analysert, er dette av et omfang som må tas hensyn til i klinikken. Det ble vist en signifikant nedgang i både vekt/BMI for pasientene. Insulinsensitiviteten viste derimot ingen forbedring etter to måneders rimonabantbehandling.

5.1 Fremtidsutsikter

Først og fremst må de tre siste CsA-pasientene ferdiganalyseres for å kunne trekke en endelig konklusjon i den farmakokinetiske interaksjonsundersøkelsen. I tillegg bør CYP og P-gp genotyping som opprinnelig var tiltenkt denne studien utføres for å kunne bestemme tilstedeværelsen av en eventuell polymorfisme hos pasientene.

På lengre sikt bør en større studie med flere nyretransplanterte pasienter og over en lengre tidsperiode utføres, for å undersøke om rimonabant har en positiv effekt på risikofaktorer for kardiovaskulær sykdom som vekt, insulinsensitivitet, lipidnivå og endotelfunksjon. Skulle rimonabant vise seg å ha gunstige effekter på de nevnte risikofaktorene, vil dette legemidlet være et godt alternativ for overvektige nyretransplanterte pasienter. Dette forutsetter at det har blitt utført en grundig kartlegging av pasientens psykiske tilstand og at det har blitt avkreftet at rimonabant øker den systemiske eksponeringen av CsA.

6. Kildeliste

1. Rikshospitalet. *Transplantasjoner*. 2008 [cited 14.01.2008]; Available from: www.rikshospitalet.no.
2. Thorsby, E., *Norsk transplantasjonsmedisin gjennom 50 år*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2006. **24**(126): p. 3305-10.
3. Herfindal, E. and D. Gourley, *Textbook of therapeutics - Drug and disease management*. 2000: Lippincott Williams & Wilkins.
4. Leivestad, T., *Annual report 2006 - The Norwegian Renal Registry*. 2007.
5. Scandiatransplant. *The Scandinavian Transplant Society*. 2008 [cited 07.01.2008]; Available from: www.scandiatransplant.org.
6. Parham, P., *The immune system*. Garland Science. 2005, New York and London.
7. Kapturczak, M.H., H.U. Meier-Kriesche, and B. Kaplan, *Pharmacology of calcineurin antagonists*. Transplantation Proceedings, 2004. **36**(2, Supplement 1): p. S25-S32.
8. Borel, J.F., *History of the discovery of cyclosporine and of its early pharmacological development*. Wiener klinische woche wochenschrift, 2002. **114**(12): p. 433-437.
9. Brunton, L.L., J.S. Lazo, and K.L. Parker, *Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 2006: McGraw-Hill.
10. Maes, B.D. and Y.F.C. Vanrenterghem, *Cyclosporin: Advantages Versus Disadvantages Vis-à-vis Tacrolimus*. Transplantation Proceedings, 2004. **36**: p. 40S-49S.
11. Statens legemiddelverk. *Preparatomtale for Prograf (SPC)*. 2007 [cited 20.11.2007]; Available from: www.legemiddelverket.no.
12. Statens legemiddelverk. *Preparatomtale for Sandimmun Neoral (SPC)*. 2007 [cited 20.11.2007]; Available from: www.legemiddelverket.no.
13. Haufroid, V., et al., *The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients*. Pharmacogenetics, 2004. **14**(3): p. 147-154.
14. Dunn, C.J., et al., *Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)I in organ transplantation*. Drugs, 2001. **61**(13): p. 1957-2016.
15. Helms, R.A., et al., *Textbook of Therapeutics - Drug and disease management*. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
16. Saeki, T., et al., *Human P-Glycoprotein Transports Cyclosporine-a and Fk506*. Journal of Biological Chemistry, 1993. **268**(9): p. 6077-6080.
17. Kuypers, D., et al., *CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 Single-nucleotide Polymorphisms Determine Long-term Tacrolimus Disposition and Drug-related Nephrotoxicity in Renal Recipients*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2007. **82**(6): p. 711-725.
18. Marzolini, C., et al., *Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **75**(1): p. 13-33.
19. Anglicheau, D., et al., *CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation*. Clin Pharmacol Ther, 2004. **75**(5): p. 422-33.

20. Sattler, M., et al., *Cytochrome-P-450 3a Enzymes Are Responsible for Biotransformation of Fk506 and Rapamycin in Man and Rat*. Drug Metabolism and Disposition, 1992. **20**(5): p. 753-761.
21. Christians, U. and K.F. Sewing, *Cyclosporine Metabolism in Transplant Patients*. Pharmacology & Therapeutics, 1993. **57**(2-3): p. 291-345.
22. Utecht, K.N., J.J. Hiles, and J. Kolesar, *Effects of genetic polymorphism on the pharmacokinetics of calcineurin inhibitors*. American Society of Health-System Pharmacists, 2006. **63**: p. 2340-2348.
23. Hu, Y.-F., et al., *Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2006. **33**: p. 1093-1098.
24. Kuehl, P., et al., *Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression*. Nat Genet, 2001. **27**(4): p. 383-91.
25. Ojo, A.O., et al., *Long-term survival in renal transplant recipients with graft function*. Kidney International, 2000. **57**: p. 307-313.
26. Ojo, A.O., *Cardiovascular Complications After Renal Transplantation and Their Prevention*. Transplantation, 2006. **82**(5): p. 603-611.
27. Armstrong, K., et al., *Free Fatty Acid Are Associated with Obesity, Insulin Resistance and Atherosclerosis in Renal Transplant Recipients*. Transplantation 2005. **80**(7): p. 937-944.
28. Baum, C.L., *Weight Gain and Cardiovascular Risk After Organ Transplantation*. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 2001. **25**(3): p. 114-119.
29. Asberg, A., *Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs - Implications for organ transplant recipients*. Drugs, 2003. **63**(4): p. 367-378.
30. Jardine, A.G., *Assessing the relative risk of cardiovascular disease among renal transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine*. Transplant International, 2005. **18**(4): p. 379-384.
31. Deleuze, S., et al., *New onset dyslipidemia after renal transplantation: Is there a difference between tacrolimus and cyclosporine?* Transplantation Proceedings, 2006. **38**(7): p. 2311-2313.
32. Quaschnig, T., et al., *Immunosuppression enhances atherogenicity of lipid profile after transplantation*. Kidney Int Suppl, 1999. **71**: p. S235-7.
33. Hjelmæsæth, J., et al., *Insulin Resistance After Renal Transplantation*. Diabetes Care, 2001. **24**(12): p. 2121-2126.
34. Vincenti, F., et al., *Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus*. American Journal of Transplantation, 2007. **7**(6): p. 1506-1514.
35. Andrews, R.C. and B.R. Walker, *Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets*. Clinical Science, 1999. **96**(5): p. 513-523.
36. Midtvedt, K., et al., *Insulin Resistance after Renal Transplantation: The Effect of Steroid Dose Reduction and Withdrawal*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. **15**: p. 3233-3239.
37. World_Health_Organization. *Obesity*. 2008 [cited 15.03.2008]; Available from: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.
38. Cofan, F., E. Vela, and M. Cleries, *Obesity in Renal Transplantation: Analysis of 2691 Patients*. Transplantation Proceedings, 2005. **37**(9): p. 3695-3697.
39. El-Agroudy, A., et al., *Weight gain after renal transplantation*. Transplantation 2004. **77**(9): p. 1381-1385.

40. Kasap, B., et al., *Effect of Obesity and Overweight on Cyclosporine Blood Levels and Renal Functions in Renal Adolescent Recipients*. Transplantation Proceedings, 2006. **38**(2): p. 463-465.
41. Clerbaux, G., E. Goffin, and Y. Pirson, *Interaction between sibutramine and cyclosporine*. American Journal of Transplantation, 2003. **3**(7): p. 906-906.
42. Després, J.-P., *The Endocannabinoid System - A New Target for the Regulation of Energy Balance and Metabolism* Critical Pathways in Cardiology, 2007. **6**: p. 46-50.
43. Statens legemiddelverk. *Preparatomtale for Acomplia (SPC)*. 2007 [cited 20.11.2007]; Available from: www.legemiddelverket.no.
44. Woods, S.C., *Role of the endocannabinoid system in regulating cardiovascular and metabolic risk factors*. American Journal of Medicine, 2007. **120**(3): p. S19-S25.
45. Patel, P.N. and R. Pathak, *Rimonabant: A novel selective cannabinoid-1 receptor antagonist for treatment of obesity*. American Society of Health-System Pharmacists, 2007. **64**: p. 481-489.
46. Després, J.-P., A. Golay, and L. Sjöström, *Effects of Rimonabant on Metabolic Risk Factors in Overweight Patients with Dyslipidemia*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**: p. 2121-34.
47. Van Gaal, L.F., et al., *Effects of the cannabinoid-1 receptor blocker rimonabant on weight reduction and cardiovascular risk in overweight patients: 1-year experience from the RIO-Europe study (vol 365, pg 1389, 2005)*. Lancet, 2005. **366**(9483): p. 370-370.
48. Scheen, A.J., et al., *Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study*. Lancet, 2006. **368**(9548): p. 1660-72.
49. Pi-Sunyer, F., et al., *Effect of rimonabant, a cannabinoid-1 receptor blocker, on weight and cardiometabolic risk factors in overweight or obese patients - RIO-North America: A randomized controlled trial*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2006. **295**(7): p. 761-775.
50. Christensen, R., et al., *Efficacy and safety of the weight-loss drug rimonabant: a meta-analysis of randomised trials*. Lancet, 2007. **370**(9600): p. 1706-1713.
51. Curioni, C. and C. Andre, *Rimonabant for overweight or obesity*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2006(4).
52. Bensaid, M., et al., *The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells*. Molecular Pharmacology, 2003. **63**(4): p. 908-914.
53. Richey, J.M., et al., *Cannabinoid receptor antagonist rimonabant increases insulin sensitivity independent of weight loss*. Diabetologia, 2007. **50**: p. S273-S274.
54. Lafontan, M., P.V. Piazza, and J. Girard, *Effects of CB 1 antagonist on the control of metabolic functions in obese type 2 diabetic patients*. Diabetes & Metabolism, 2007. **33**: p. 85-95.
55. Xie, S., et al., *The endocannabinoid system and rimonabant: a new drug with a novel mechanism of action involving cannabinoid CB1 receptor antagonism--or inverse agonism--as potential obesity treatment and other therapeutic use*. J Clin Pharm Ther, 2007. **32**(3): p. 209-31.
56. European_Medicines_Agency. *Acomplia*. 2008 [cited 23.02.2008]; Available from: <http://www.emea.europa.eu/humandocs/Humans/EPAR/acompria/acompria.htm>.
57. Sanofi_Aventis_on_file, *Investigating the potensial for SR141716 to inhibit cytochrome P450 (CYP) enzymes using human liver microsomes in vitro*. MIH0014, Sec. 5.3.2.2.

-
58. Sanofi_Aventis_on_file, *An interaction study to investigate a potential effect of SR141716 on pharmacokinetic parameters of midazolam in young healthy male subjects*. INT5006, Sec. 5.3.3.4.
 59. Statens legemiddelverk. *Legemidler under særlig overvåkning pr 16.04.2008*. 2008 [cited 02.05.2008]; Available from: http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage_71161.aspx.
 60. De nasjonale forskningsetiske komiteer. *Helsinkideklarasjonen*. 2008 [cited 26.03.2008]; Available from: <http://www.etikkom.no/retningslinjer/helsinkideklarasjonen>.
 61. World_Health_Organization. *Diabetes*. 2008 [cited 03.04.2008]; Available from: http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf.
 62. Grill, V., et al., *Nye diagnostiske kriterier for diabetes mellitus - hvorfor?* Tidsskrift for Den norske legeforening, 2000. **120**: p. 1876-7.
 63. Falck, P., et al., *Determination of ciclosporin A and its six main metabolites in isolated T-lymphocytes and whole blood using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2007. **852**(1-2): p. 345-352.
 64. Taylor, P., et al., *A high-throughput LC/MS/MS method for tacrolimus measurement in kidney and liver transplant patients*. Waters Corporation, 2007.
 65. Keevil, B.G., et al., *Evaluation of a rapid micro-scale assay for tacrolimus by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Annals of Clinical Biochemistry, 2002. **39**: p. 487-492.
 66. European_Medicines_Agency. *Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence*. 2008 [cited 03.03.2008]; Available from: <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/ewp/140198en.pdf>.
 67. Nankivell, B.J., et al., *Predicting Glomerular-Filtration Rate after Kidney-Transplantation*. Transplantation, 1995. **59**(12): p. 1683-1689.
 68. Sanofi_Aventis_on_file, *An interaction study to investigate a potential effect of SR141716 on pharmacokinetic parameters of digoxin in young healthy male subjects*. INT3786, Sec. 5.3.3.4.
 69. Lin, J.H., *Drug-drug interaction mediated by inhibition and induction of P-glycoprotein*. Adv Drug Deliv Rev, 2003. **55**(1): p. 53-81.
 70. Akhlaghi, F., et al., *Effect of simvastatin on cyclosporine unbound fraction and apparent blood clearance in heart transplant recipients*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1997. **44**(6): p. 537-542.
 71. Akhlaghi, F., et al., *Cyclosporine plasma unbound fraction in heart and lung transplantation recipients*. Therapeutic Drug Monitoring, 1999. **21**(1): p. 8-16.
 72. Scheen, A.J., *Cannabinoid-1 receptor antagonists in type-2 diabetes*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2007. **21**(4): p. 535-53.
 73. Yamauchi, T., et al., *The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity*. Nature Medicine, 2001. **7**(8): p. 941-946.
 74. Osei-Hyiaman, D., et al., *Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(5): p. 1298-1305.

APPENDIKS

Reagenser

<i>Reagenser</i>	<i>Leverandør</i>
Acetonitril (ACN), HPLC grade	Merck, Darmstadt, Tyskland
AM1, AM9 og AM1c	Novartis, Basel, Sveits
AM4N, AM19 og AM1c9	Gave fra Dr. U. Christians, University of Colorado Health Science Center, Denver,
Ammoniakk-løsning, 25 %:	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ammoniakk-lösung zur Analyse	
Ciklosporin A	Novartis, Basel, Sveits
Ciklosporin C	Novartis, Basel, Sveits
Deionisert vann fremstilt ved hjelp av Easypure UV	Barnstead, Iowa, USA
Heparin 100 IE/ml	LEO Pharma AS, Oslo, Norge
Maursyre: Ameisensäure 98-100 % zur Analyse	Merck, Darmstadt, Tyskland
Metanol: Methanol, HPLC grade	Merck, Darmstadt, Tyskland

Løsninger

- Ammoniumacetat ($\text{NH}_4^+\text{COO}^-$)-buffer, 20mM, pH 3,6. En liter ionebyttet avnn ble tilsatt 1,5 ml 25 % ammoniakkløsning. Maursyre ble dråpevis tilsatt til blandingen til pH 3,6.
- Mobilfase A: ACN/20mM $\text{NH}_4^+\text{COO}^-$ (20:80 v/v): 100 ml ACN og 400 ml 20mM $\text{NH}_4^+\text{COO}^-$ ble blandet. Oppbevaring ved romtemperatur.
- Mobilfase B: ACN/20mM $\text{NH}_4^+\text{COO}^-$ (80:20 v/v): 400 ml ACN og 100 ml 20mM $\text{NH}_4^+\text{COO}^-$ ble blandet. Oppbevaring ved romtemperatur.
- Stamløsninger av CsA, metabolitter og CsC, $\mu\text{g/mL}$: Tørrstoffene ble innveid og løst i metanol. Oppbevaring ved $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Utstyr

<i>Utstyr</i>	<i>Leverandør</i>
EDTA-rør, BD Vacutainer®	Plymouth, England
Fast-fase-kolonne: Water Oasis®, HLB 1cc (30 mg) Extraction Cartridge	Waters Corporation, Ireland
HemoCue Glukose 201+	HemoCue AB, Ängelholm, Sverige
Heparinrør, BD Vacutainer®	NJ, USA
pH-meter m/bufferløsninger: 50pH Meter Beckman Instruments Inc.	California, USA
Sentrifuge: Universal 32 R, Hettlich Zentrifugen	Tuttlingen, Tyskland
Serumrør med gel, BD Vacutainer®	Plymouth, England
Ultralydbad: Bandelin Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin, Tyskland
Vakum-sentrifuge system, Speedvac®,	Thermo Electron Corporation, Milford, MA, Canada
Whirlmikser: Bio Vortex V1, Biosan,	Montebello Diagnostics A/S Oslo, Norge
Whirlmikser: MS1 Minishaker, IKA-Works Inc.	Wilmington, CA, USA

Demografiske parametere for pasientene

Tabell 1: Sentrale demografiske parametere for CsA-pasientene før og etter rimonabantbehandling. Tallene er oppgitt som gjennomsnittsverdier \pm standardavvik dersom ikke annet er oppgitt

	CsA alene n = 10	CsA + rimonabant n = 9	P- verdi
Døgndose CsA (mg/dag)	200 \pm 48	200 \pm 48	
Vekt (kg)	95,7 \pm 2,7	93,5 \pm 7,1	0,005
BMI (kg/m ²)	32,5 \pm 3,3	31,9 \pm 3,5	0,005
Blodprøvesvar			
P-Kreatinin (μ mol/L)	119 \pm 46	121 \pm 51	0,810
P-Urea (mmol/L)	11,2 \pm 5,4	10,2 \pm 5,5	0,214
GFR, estimert (mL/min)	77 \pm 24	77 \pm 25	0,895
P-Total kolesterol (mmol/L)	5,6 \pm 1,1	5,3 \pm 1,2	0,137
P-HDL-kolesterol (mmol/L)	1,6 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7	0,475
P-LDL-kolesterol (mmol/L)	3,3 \pm 1,0	3,2 \pm 0,9	0,173
P-Triglyserider (mmol/L)	2,8 \pm 2,4	1,5 \pm 0,8	0,140

Forkortelser: P = i plasma, BMI = body mass index, GFR = glomerulær filtrasjonsrate
HDL = high density lipoproteins, LDL = low density lipoproteins

Tabell 2: Sentrale demografiske parametere for Tac-pasientene før og etter rimonabantbehandling. Tallene er oppgitt som gjennomsnittsverdier \pm standardavvik dersom ikke annet er oppgitt

	Tac alene n = 8	Tac + rimonabant n = 8	P- verdi
Døgndose Tac (mg/dag)	5,6 \pm 2,4	5,6 \pm 2,5	
Vekt (kg)	97,4 \pm 22,2	95,7 \pm 21,7	0,062
BMI (kg/m ²)	32,7 \pm 4,7	32,1 \pm 4,5	0,057
Blodprøvesvar			
P-Kreatinin (μ mol/L)	103 \pm 17	110 \pm 29	0,291
P-Urea (mmol/L)	8,5 \pm 3,0	8,6 \pm 4,1	0,773
GFR, estimert (mL/min)	81 \pm 10	79 \pm 13	0,296
P-Total kolesterol (mmol/L)	4,7 \pm 0,6	4,5 \pm 0,5	0,210
P-HDL-kolesterol (mmol/L)	1,3 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	0,577
P-LDL-kolesterol (mmol/L)	2,8 \pm 0,5	2,6 \pm 0,4	0,201
P-Triglyserider (mmol/L)	1,9 \pm 0,7	1,6 \pm 0,6	0,206

Forkortelser: P = i plasma, BMI = body mass index, GFR = glomerulær filtrasjonsrate
HDL = high density lipoproteins, LDL = low density lipoproteins

Farmakokinetiske parametere for CsA-pasientene

Tabell 3: Sentrale farmakokinetiske parametere for CsA før og etter behandling med 20 mg rimonabant inkludert pasienten med atypisk farmakokinetikk ved baseline. Alle variablene ble ln transformert før bioekvivalensanalysen og ble deretter analysert med Wilcoxon's test for parsammenligning.

	CsA alene n = 6	CsA + rimonabant n = 6	p-verdi	90 % KI av ratio
AUC ₀₋₁₂ (ng t/ mL)	3132 ± 270	4018 ± 307	0,028	1,17 – 1,41
C _{max} (ng t/ mL)	609 ± 163	974 ± 314	0,028	1,12 – 2,28
C ₂ (ng t/ mL)	604 ± 174	974 ± 314	0,173	1,11 – 2,39
C ₀ (ng t/ mL)	175 ± 19	184 ± 26	0,028	0,99 – 1,11
CL/F (L/t)	33,7 ± 8,5	26,0 ± 4,6	0,028	0,71 – 0,85
T _{1/2} (t)	14,0 ± 11,3	10,8 ± 4,8	0,600	0,61 – 1,28
T _{max} (t)	2,3 ± 0,8	2,0 ± 0,1	0,684	

Forkortelser:

AUC = arealet under konsentrasjonskurven

CL = clearance

C_{max} = maksimal konsentrasjon

C₀ = konsentrasjon før dose

C₂ = konsentrasjon 2 timer etter dose

F = biotilgjengelighet

T_{1/2} = halveringstid

T_{max} = tiden fra inntak av legemiddel til C_{max}

Anmerkninger:

¹Ratio = Tac + rimonabant/tac

Individuelle konsentrasjoner av CsA

Tabell 4: Konsentrasjon av CsA (ng/mL) før rimonabantbehandling ved ulike tidspunkt etter dose for hver av pasientene

Tid (t)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12
Pas 2	209	210	212	226	491	747	368	255	235	222	212	210
Pas 4	188	189	193	283	435	669	411	258	250	213	216	224
Pas 5	166	168	145	173	374	572	455	315	235	169	186	173
Pas 7	161	157	163	195	441	654	427	265	210	175	154	162
Pas 8	164	151	161	168	222	269	279	299	250	202	177	181
Pas 11	163	158	158	273	341	711	501	319	222	175	170	163

Anmerkninger: Pasient 1, 12, 13 og 15 ble ikke analysert grunnet svikt i analyseapparat

Tabell 5: Konsentrasjon av CsA (ng/mL) etter rimonabantbehandling ved ulike tidspunkt etter dose for hver av pasientene

Tid (t)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12
Pas 2	213	215	213	263	747	771	432	298	242	225	229	216
Pas 4	211	198	225	598	591	828	368	326	278	237	250	252
Pas 5	192	184	165	211	393	681	616	379	377	319	261	212
Pas 7	179	178	170	212	451	1320	627	331	250	205	198	191
Pas 8	162	173	177	279	681	1422	525	350	318	209	170	219
Pas 11	147	148	49	180	516	819	581	319	221	226	202	177

Anmerkninger: Pasient 1 ble ekskludert fra studien før andre undersøkelsesdag. Pasient 12, 13 og 15 ble ikke analysert grunnet svikt i analyseapparat

Individuelle konsentrasjoner av Tac

Tabell 6: Konsentrasjon av Tac (ng/mL) før rimonabantbehandling ved ulike tidspunkt etter dose for hver av pasientene

Tid (t)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12
Pas 3	6,5	6,8	6,8	7,2	7,5	8,6	10,2	9,3	7,3	7,8	6,6	5,6
Pas 6	4,7	4,5	4,7	6,2	6,8	8,7	8,8	7,9	9,7	5,8	5,8	6,3
Pas 9	7,0	7,0	7,2	8,6	9,3	10,6	13,2	10,1	9,1	9,0	7,6	7,3
Pas 10	7,7	7,9	9,2	10,3	11,3	12,1	12,7	12,5	12,5	11,5	9,6	9,6
Pas 14	11,4	11,6	11,6	11,3	11,6	11,8	15,5	13,9	12,9	11,9	10,6	10,5
Pas 16	6,2	5,5	5,5	7,2	10,0	11,5	10,8	9,2	7,6	6,7	6,3	5,7
Pas 19	6,2	5,8	5,3	6,5	9,2	11,0	11,1	10,1	7,8	6,6	5,2	4,2
Pas 20	5,8	5,6	6,5	9,4	9,1	8,8	8,1	7,4	7,2	6,6	5,8	5,5

Tabell 7: Konsentrasjon av Tac (ng/mL) etter rimonabantbehandling ved ulike tidspunkt etter dose for hver av pasientene

Tid (t)	0	0,25	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12
Pas 3	5,1	5,1	4,6	5,7	6,3	6,4	7,9	10,9	7,2	5,8	5,3	5,0
Pas 6	5,4	4,4	4,8	7,2	9,7	21,9	15,5	11,5	7,7	6,6	5,9	4,8
Pas 9	6,1	5,7	5,7	6,8	8,4	8,9	10,5	9,2	8,1	7,9	6,2	5,6
Pas 10	7,3	7,5	7,6	8,4	10,9	18,2	14,6	12,3	9,7	7,8	7,6	7,4
Pas 14	10,9	10,7	11,1	11,9	14,2	18,8	17,4	15,3	13,0	12,2	11,3	10,2
Pas 16	6,3	7,1	6,7	7,5	8,1	10,3	9,6	7,9	7,7	7,2	7,0	6,3
Pas 19	5,3	5,2	5,5	5,9	7,3	10,1	11,9	10,4	8,9	7,3	6,1	5,1
Pas 20	3,6	3,6	5,9	7,3	7,1	6,4	6,2	6,8	4,8	4,8	3,9	4,1

Studieprotokoll

PILOT study:

The effect of rimonabant treatment on cardiovascular risk factors in renal transplant recipients

- assessing the pharmacokinetic interaction with calcineurin inhibitors

Responsible investigator:

Karsten Midtvedt, MD, Ph.D, Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Co-investigators:

Ida Robertsen, Master grade student (Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Trond Jenssen, Professor, MD, Ph.D., Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Willy Aasebø, MD, Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Anders Hartmann, Professor, MD, Ph.D., Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Rune Amundsen, Research fellow, M.Sc.(Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Eva Skovlund, Professor, Ph.D., Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Anders Åsberg, Professor, Ph.D., Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Background:

Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center is one of the 10 biggest transplant centers in the world. Between 220 and 265 kidney transplants are performed annually and the transplant pool consist of about 2500- 3000 patients in Norway. At present the most challenging task to further improve long-term results in these patients is the increasing cardio-vascular morbidity and mortality. A renal transplant patient 30 years of age has approximately the same cardio-vascular risk as a 70 years old person in the general population [75]. It has previously been shown that these patients suffer from hypertension, impaired glucose tolerance(IGT)/post transplant diabetes mellitus (PTDM), dyslipidemia as well as endothelial dysfunction [76-82]. Lately obesity has also become an increasing problem in this population and about 20% of renal transplant recipient in Norway develop obesity ($BMI > 27 \text{ kg/m}^2$) following transplantation (Data from the Norwegian Nephrology Register).

Rimonabant is not only effective in reducing weight, but has also shown to improve insulin sensitivity in obese patients [48]. There are also preliminary data indicating a positive effect on endothelial function [83-86]. Rimonabant is metabolized both via CYP3A4 as well as amidohydrolase to inactive metabolites (SmPC for rimonabant). Calcineurin inhibitors (cyclosporine, CsA and tacrolimus, Tac) are the corner stones in immunosuppressive regimens around the world. Both CsA and Tac are also metabolized via CYP3A4 and no specific pharmacokinetic interaction studies have so far been performed to investigate this possible bilateral interaction. However, data on file performed in microsomes does not indicate that rimonabant inhibits CYP3A4 metabolism or P-glycoprotein transport (Sanofi on file: MIH0014, INT3786, INT5006).

Ethical considerations:

Renal transplant recipients die prematurely due to cardio-vascular disease. A 30 year old transplant recipient has approximately the same cardio-vascular risk as a 70 year old person in the general population. It is therefore important to further elucidate on these problems, trying to prevent the development of cardiovascular disease as far as possible. It is therefore of interest to investigate the effects of rimonabant on obesity, insulin sensitivity as well as endothelial function. However, renal transplant recipients are treated with life-long immunosuppressive therapy in order to prevent acute rejection episodes. The calcineurin inhibitors (CsA and Tac) are the back-bones in the immunosuppressive treatment and they

have a very narrow therapeutic index. It is therefore essential to assure that new drug to be used in transplanted patients do not interact with CsA and Tac before they are included in the over all therapy. Even though rimonabant is metabolized via the same enzyme as CsA and Tac (CYP3A4) previous in vitro and in vivo studies with relevant probe drugs in healthy volunteers do not indicate the presence of any relevant pharmacokinetic interaction. However, to be absolutely sure that it is safe to administer rimonabant in transplanted patients a pilot study of 12-hour pharmacokinetic interaction investigation in 16 patients (8 patients on CsA and 8 patients on Tac) will be performed before a larger study to investigate the cardio-vascular effects can be initiated.

Rationale

Rimonabant is an interesting drug for the treatment of transplanted patients. Present data also indicate that rimonabant does not interact with essential immunosuppressive drugs (CsA and Tac) but to be completely sure that it is safe to administer rimonabant to this patient population a pilot pharmacokinetic interaction study has to be performed.

Study objectives:

The primary objective of the present study is to investigate the possible pharmacokinetic interaction of rimonabant on CsA and Tac, respectively. Secondary will also an assessment of changes in insulin sensitivity be investigated.

Study design:

This is a prospective, open, non-randomized study. Eligible renal transplant recipients treated with either CsA or Tac are eligible for inclusion and treatment with 20 mg rimonabant per day for two month. All patients should perform a pregnancy test prior to inclusion in the study. Baseline investigations of CsA/Tac pharmacokinetics and insulin sensitivity will be performed prior to (but not more than 4 days prior to) first drug administration. After two months the investigations performed at baseline will be performed again. For safety reasons are three extra visits included in the study, 1, 2 and 4 weeks after start of study treatment. On these visits CsA/Tac concentrations will be monitored and a general physical investigation performed.

Patients

The patients will primarily be recruited from the great-Oslo area and all study visits will be performed at Rikshospitalet. Patients will otherwise follow standard posttransplant

procedures at their local hospital during the study period. Patients included in other clinical trials are also eligible for inclusion the present study.

Informed consent will be obtained according to the Declaration of Helsinki and GCP. Patients and investigator will sign the patient information which will be kept on file. The patient will receive a copy of the patient information. The patient data will be recorded in Case Report Forms (CRF) and all information will be handled confidentially. Any complications will be recorded.

Inclusion criteria:

- Renal transplant recipient with stable renal function (less than 20% deviation in serum creatinine the last 2 months).
- Renal transplant recipient currently on CsA or Tac and prednisolone based immunosuppression.
- BMI > 30 kg/m² or >27 kg/m² in combination with one or more cardio-vascular risk factors.
- >18 years of age.
- Male patient, or female patient without childbearing potential (surgically sterilized or postmenopausal) or, if female of childbearing potential, is not lactating, has a negative pregnancy test at screening and is willing to utilize an effective method of contraception throughout the study period and for 90 Days following discontinuation of the Study Drugs.
- Signed informed consent.

Exclusion criteria:

- Diabetes mellitus
- Severe liver disease.
- Depressive-, anxiety- or sleeping disorders.
- Estimated GFR < 25 ml/min.
- Epilepsy.

- Pregnant or nursing mothers.
- Concomitant treatment with CYP3A4 inhibitors (www.cyp450.no) with interaction potential according to the investigator.

Study procedures

Calcineurin pharmacokinetics:

Whole-blood samples (4 mL Heparin/EDTA vacutainer tubes) for determination of whole-blood CsA or Tac concentration will be taken before administration of CsA/Tac (0 hours) and: 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, and 12 hours following administration.

Whole-blood (7 mL EDTA vacutainer tube) will be drawn once during the study for determination of *CYP3A5**3 and *MDR-1* (*G1199A*, *C1236T*, *G2677T*, *G2677A*, *G2677G* and *C3435T*) genotyping.

Insulin sensitivity:

Oral glucose tolerance test; measurements of serum glucose and insulin before and 120 minutes following orally administration of 75 g glucose. Insulin sensitivity index for transplanted (ISI_{Tx}) calculated as $ISI_{Tx} = 0.208 - 0.0032 * BMI - 0.0000645 * Ins_{120} - 0.00375 * Gluc_{120}$. The test will be performed parallel with the pharmacokinetic investigation.

Clinical information

Demographic data of the included patients should be registered in CRF's; age, height, weight, existing hepatic/renal insufficiencies, concomitant drugs, changes in physical activity, diet and other potential cofactors that might affect the results.

Any adverse events will also be recorded in the CRF and reported in according to guidelines. SUSARs will be reported in paper form on standard CIOMS-forms.

Compliance

Compliance issues are not expected in this patient population. However, compliance will be assured by tablet counting at 2 months.

Laboratory methods:

CsA and its main metabolite concentrations at the days of 12-hour pharmacokinetic investigations will be analyzed by a validated HPLC-MS/MS method at the School of

Pharmacy, University of Oslo while clinical CsA and all Tac concentrations will be performed as standard analyses at the Department of Medical Biochemistry, Rikshospitalet.

Plasma glucose concentrations are measured by HemocureAB™ B-glucose Analyser.

Serum insulin analyzed in two parallels with Immulite Insulin kit on the Immulite 2000 platform.

The genotyping will be performed at the School of Pharmacy, University of Oslo by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism assays using specific primers and restriction enzymes followed by separation on 3% agarose gels.

Withdrawals:

Premature discontinuation of treatment will significantly lower the power of the study and patients should therefore attempt to remain on treatment unless there are compelling reasons for discontinuation.

Such compelling reasons include development of moderate to severe depressive-, anxiety- or sleeping disorders; onset of diabetes mellitus or other adverse events that, for intensity or nature, make the patient medically unfit to continue on treatment; development of conditions that may, in the view of the attending physician, jeopardize the patient's condition.

Furthermore, each patient is free to express the wish to withdraw.

Information to study personnel

All involved study personnel will receive the full study protocol and they will in addition be informed on a start-up meeting about the study procedures. Any changes during the study will be distributed by the principal investigator via e-mail to all involved study personnel.

Calculations

Standard descriptive non-compartmental calculations of the pharmacokinetics parameters; AUC_{0-12} , C_0 , C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$ and C_{12} will be determined. C_{max} , C_0 and T_{max} and C_{12} will be reported as actually measured values. AUC_{0-12} will be calculated by the trapeze method. Terminal half-life ($T_{1/2}$) will be determined as the slope of the semi logarithmic plot of at least three points of the terminal elimination phase.

Insulin sensitivity (ISI_{Tx}) is calculated as $0.208 - 0.0032 * BMI - 0.0000645 * Ins120 - 0.00375 * Gluc120$.

Statistical considerations

Number of patients

Based on the assumption that a change in CsA/Tac AUC of 35% is clinically relevant and a relative standard deviation of 25% (for both CsA and Tac) 8 patients on each drug are needed to assure a power of 80% at a 5% significance level. Patients dropping out of the study will be substituted.

Formula for total sample-size calculation:

$$n = \frac{2 \times SD^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} \times 7.9$$

Analysis plan:

The pharmacokinetic data will be analyzed by comparing the CsA, respectively Tac AUC₀₋₁₂ ratio between before and after concomitant rimonabant treatment in accordance with the bioequivalence criteria of 80-125%. Data will be transformed to obtain normal distribution if appropriate.

Study drug

The patients randomized to rimonabant treatment will be treated with study drug labeled with the following information:

Til klinisk utprøving
 RIMONA-07-PILOT study
 Hovedutprøver: Overlege Karsten Midtvedt, Rikshospitalet. Tlf: 23 07 00 00
 Pasient nr:
 Pasient initialer:
 Dato utlevert:

Acomplia[®] (rimonabant) 20 mg tabletter
 1 tablett før frokost hver morgen.
 Oppbevares utilgjengelig for barn

Study drug administration will be performed in cooperation with the Pharmacy at Rikshospitalet.

Study duration

Each transplanted patient will be followed for 2 months.

First patient in: Q4 2007.

Anticipated recruitment time: 6 months.

Last patient out: Q3 2008

Insurance

The patients are insured according to Act of Product Responsibility.

References

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:S112-119.
2. Hjelmestaeth J, Hartmann A, Kofstad J, Stenstrom J, Leivestad T, Egeland T, Fauchald P. Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age. *Transplantation* 1997; 64:979-983.
3. Hjelmestaeth J, Hartmann A, Leivestad T, Holdaas H, Sagedal S, Olstad M, Jenssen T. The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events. *Kidney Int* 2006; 69:588-595.
4. Hjelmestaeth J, Midtvedt K, Jenssen T, Hartmann A. Insulin resistance after renal transplantation: impact of immunosuppressive and antihypertensive therapy. *Diabetes Care* 2001; 24:2121-2126.
5. Hausberg M, Kisters K, Kosch M, Rahn KH, Barenbrock M. Flow-mediated vasodilation and distensibility of the brachial artery in renal allograft recipients. *Kidney Int* 1999; 55:1104-1110.
6. Åsberg A, Berg KJ, Hartmann A. Each administration of cyclosporin A enhances skin microvascular reactivity in renal transplant recipients. *Microvasc Res* 2000; 60:81-90.
7. Midtvedt K, Hartmann A, Foss A, Fauchald P, Nordal KP, Rootwelt K, Holdaas H. Sustained improvement of renal graft function for two years in hypertensive renal transplant recipients treated with nifedipine as compared to lisinopril. *Transplantation* 2001; 72:1787-1792.
8. Holdaas H, Fellström B, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, Grönhagen-Riska C, Madsen S, Neumayer HH, Cole E, Maes B, Ambuhl P, Olsson AG, Hartmann A, Solbu DO, Pedersen TR. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361:2024-2031.

9. Scheen AJ, Finer N, Hollander P, Jensen MD, Van Gaal LF. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 2006; 368:1660-1672.
10. Ho WS, Hiley CR. Vasodilator actions of abnormal-cannabidiol in rat isolated small mesenteric artery. *Br J Pharmacol* 2003; 138:1320-1332.
11. Bouchard JF, Lepicier P, Lamontagne D. Contribution of endocannabinoids in the endothelial protection afforded by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Life Sci* 2003; 72:1859-1870.
12. Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14136-14141.
13. Randall MD, Alexander SP, Bennett T, Boyd EA, Fry JR, Gardiner SM, Kemp PA, McCulloch AI, Kendall DA. An endogenous cannabinoid as an endothelium-derived vasorelaxant. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229:114-120.
14. Midtvedt K, Hartmann A, Hjelmessaeth J, Lund K, Bjerkely BL. Insulin resistance is a common denominator of post-transplant diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:427-431.
15. Hume R. Prediction of lean body mass from height and weight. *J Clin Pathol* 1966; 19:389-391.
16. Åsberg A, Hartmann A, Fjeldså E, Holdaas H. Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1920-1924.
17. Mitrakou A, Vuorinen-Markkola H, Raptis G, Toft I, Moka M, Strumph P, Pimenta W, Veneman T, Jenssen T, Bolli G, et al. Simultaneous assessment of insulin secretion and insulin sensitivity using a hyperglycemia clamp. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:379-382.

18. Midtvedt K, Hjeltnesaeth J, Hartmann A, Lund K, Paulsen D, Egeland T, Jenssen T. Insulin resistance after renal transplantation: the effect of steroid dose reduction and withdrawal. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:3233-3239.
19. Bryhni B, Jenssen TG, Olafsen K, Eikrem JH. Age or waist as determinant of insulin action? *Metabolism* 2003; 52:850-857.

Pasientinformasjon og samtykkeerklæring

Forespørsel om å delta i forskningsprosjektet:

Rimonabants effekter på immundempende legemidlers blodkonsentrasjoner og insulinfølsomheten hos nyretransplanterte pasienter

Dette er en forespørsel til deg som har gjennomgått en vellykket nyretransplantasjon og som er overvektig om å delta i en klinisk studie. I denne studien skal sikkerheten ved bruk av det vektreduserende medikament (rimonabant; Acomplia®) i kombinasjon med ciklosporin (Sandimmun Neoral®) eller takrolimus (Prograf®) undersøkes. I tillegg skal også effekten på kroppens følsomhet overfor insulin undersøkes. Studien er en nasjonal studie som leger ved Rikshospitalet har tatt initiativ til, i samarbeid med forskere ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo.

Formål med studien:

Etter transplantasjonen trenger du legemidler som demper immunforsvaret ditt slik at det nye organet ikke skal avstøtes. Behandlingen med disse medikamentene kan gi en del bivirkninger som øker risikoen for hjerte-karsykdomer. Overvekt er også en risikofaktor for hjerte-karsykdom. For et nytt vektreduserende legemiddel (rimonabant; Acomplia®) finnes det indikasjoner på at det kan påvirke flere risikofaktorer for hjerte-karsykdom i tillegg til å redusere vekten, noe som i seg selv er gunstig med tanke på hjerte-karsykdom. Hovedformålet med denne forstudien er å undersøke om Acomplia® påvirker blodkonsentrasjonene til Sandimmun Neoral®/Prograf® (du bruker en av disse fra før). I tillegg skal det undersøkes hvordan behandling med Acomplia® påvirker insulinfølsomheten, en kjent risikofaktor for hjerte-karsykdom. Vi vil utføre disse undersøkelsene før og etter 2 måneders behandling med den nye legemidlet Acomplia®.

Legemidlene:

Du skal ta en tablett Acomplia® (20 mg) før frokost hver morgen i 2 måneder, med start dagen etter første undersøkelsesdag.

Studieprosedyre:

Studien strekker seg over 2 måneder og du må komme på inntil fem besøk på Rikshospitalet. Hvis du er kvinne og er i fertil alder må du bruke sikker prevensjon under, og inntil 90 dager etter, studien. Hvis du er gravid, eller ammer kan du ikke delta i studien. Hvis du bruker, eller under studien begynner å bruke helsekostpreparater, naturmidler eller legemidler som er forskrevet fra en lege som ikke er din faste nefrolog må du si fra til studielegen om dette. Følgende undersøkelser skal gjøres ved start av studien og ved avslutning etter 2 måneder:

Farmakokinetikk: I denne delen vil vi undersøke om Acomplia® påvirker Sandimmun Neoral®/Prograf® nivåene ved å ta en blodprøve før inntak av medisinerne, samt 11 blodprøver fordelt over de neste 12 timene etter inntak. Vi vil legge inn en venflon i underarmen slik at du bare blir stukket en gang per undersøkelsesdag. Du vil få frokost, lunsj og middag på sykehuset denne dagen. Frem til lunsj tas det tette prøver, men etter lunsj vil prøvene tas sjeldnere, og du har da anledning til å bevege deg fritt rundt i nærområdet. Undersøkelsen i seg selv er ikke forbundet med smerte, men du vil kjenne et stikk når du får lagt inn venflonen i armen. I prøvene vi tar av deg vil vi analysere legemiddelkonsentrasjoner (Sandimmun Neoral®/Prograf®), eggehvitestoffer og hvilke gener du bærer på som uttrykker noen av eggehvitestoffene som er involverte i nedbrytningen av Sandimmun Neoral®/Prograf® (så som CYP3A4, CYP3A5 og P-glykoprotein). Disse analysene vil bli utført ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Oral glukosebelastning: Denne undersøkelsen gjøres parallelt med undersøkelsen av blodnivåene av Sandimmun Neoral[®]/Prograf[®], under de første 2 timene. Du vil få 75g sukker oppløst i vann å drikke og det vil tas en ekstra blodprøve ved start og etter 2 timer for analyse av blodsukker og insulin til denne undersøkelsen.

Ved hvert besøk vil vi måle vekt, blodtrykk og sjekke at du er alminnelig frisk.

Fordeler, ulemper og risiko ved å delta i denne studien:

Du vil sannsynligvis gå ned i vekt under denne studien, noe som er positivt for din generelle helsetilstand. I tillegg vil du bidra til å øke kunnskapen om hvordan Acomplia[®] virker på nyretransplanterte pasienter som bruker Sandimmun Neoral[®]/Prograf[®], og denne kunnskapen vil hjelpe oss å designe en større studie for å undersøke langtidseffekten av Acomplia[®] på transplanterte pasienter på en optimal måte. Ulempen ved å delta vil være at det vil bli tatt noe ekstra blod og at du vil være nødt til å komme til Rikshospitalet noen ekstra, og iblandt lange, undersøkelsesdager. Acomplia[®] er generelt godt tolerert, men det er rapportert bivirkninger. De vanligste bivirkningene registrert så langt er; kvalme, magesmerter, infeksjoner i de øvre luftveier, søvnforstyrrelser, nervøsitet, irritabilitet, angst, depresjon, svimmelhet, hukommelsestap, hetetokter, hudutslett, muskelsmerter og slapphet. Spesielt ser det ut til at pasienter som tidligere har hatt depresjon har stor risiko for å få depresjon på ny. Du kan derfor ikke delta i studien hvis du har, eller tidligere har hatt, depresjon. Nye bivirkninger som enda ikke er beskrevet kan forekomme da dette er et relativt nylig godkjent legemiddel. Hvis du føler noe ubehag ved behandlingen må du melde fra til din studielege så fort som mulig. Hvis vi oppdager noe ved din helse under denne studien som krever videre oppfølging vil vi sørge for at du får det.

Frivillig deltakelse:

Deltakelse i denne studien er frivillig. Du kan når som helst trekke ditt samtykke til å være med i studien uten å oppgi noen grunn til dette. Din videre oppfølging som transplantert vil ikke bli påvirket av din beslutning om å delta eller ikke å delta i denne studien. Prøvene tatt fra deg vil inngå i en såkalt biobank og kun brukes til de analysene som er nevnt i denne informasjonen. Det vil i praksis si at de blir oppbevart i en fryseboks hos oss. Hvis du bestemmer deg for å trekke deg fra studien vil vi ikke samle inn ytterligere informasjon om deg eller ta noen ytterligere prøver, til studien men prøvene og dataene som allerede er samlet inn vil analyseres og inngå i studien. Hvis det er behov for prøver av annen klinisk grunn vil de selvfølgelig bli tatt uten hensyn til avsluttet studiedeltakelse.

Innsyn i journal og personvern:

All informasjon som innhentes om deg i forbindelse med denne studien vil bli behandlet konfidensielt. Statens Legemiddelverk, eller andre kontrollmyndigheter, vil imidlertid kunne ha behov for å sjekke at opplysninger gitt i studien stemmer overens med opplysninger i pasientjournalen din. Dette gjøres for å sikre studiens kvalitet. Du kan når som helst kreve at de helse- og personopplysningene vi har samlet inn om deg blir utlevert til deg. Hvis du oppdager at noen av opplysningene vi har på deg er feilaktige så har du rett til å kreve at vi retter på dette.

Resultatene fra forsøket vil bli publisert i vitenskapelige tidsskrifter. Resultatene dine vil bli aidentifisert, det vil si at ditt navn erstattes med et kodenummer og at ingen bortsett fra forsøksleder kan spore de enkelte resultater tilbake til deg. Dataene og prøvene dine vil lagres i 15 år etter at sluttrapport for studien er skrevet. Etter det vil dataene bli anonymisert og prøvene destruert. Tidspunktet for dette vil være avhengig av hvor lang tid det tar før studien er ferdig. Alt involvert personale som håndterer opplysninger om deg har taushetsplikt. Du vil etter hvert kunne få informasjon om studiens resultater ved henvendelse til hovedansvarlig lege for denne studien, overlege Karsten Midtvedt ved Nyreseksjonen, Rikshospitalet.

Forsikring:

Du vil som deltaker i denne studien være dekket av en forsikring via Legemiddelansvars-foreningen.

Studien er godkjent av Statens legemiddelverk og har vært vurdert av Regional Komité for Medisinsk Forskningsetikk, Helseregion sør, Sosial- og helsedirektoratet og Personvernombudet ved Rikshospitalet.

Denne skriftlige informasjon skal ledsages av muntlig informasjon. Har du spørsmål må du kontakte din behandlende lege. Du vil få en kopi av denne informasjonen og denne bør du spare på.

Hovedansvarlige lege for denne studien er overlege Karsten Midtvedt, Nyreseksjonen, Medisinsk avdeling ved Rikshospitalet (23 07 18 94). Ansvarlig person for biobanken er professor Anders Åsberg, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo (22 85 65 59). Studien finansieres via driftsmidler ved Rikshospitalet og Universitetet i Oslo.

Din lokalt ansvarlige lege er:

Undertegnede lege har gitt muntlig informasjon om studien og gitt pasienten tilbakemelding på eventuelle spørsmål:

Legens stempel og underskrift

Dato (må føres av legen)

SAMTYKKEERKLÆRING

Undertegnede har lest og er blitt forklart innholdet i denne informasjonen og fått utlevert kopi av den.
Jeg er villig til å delta i studien.

Pasientens underskrift

Dato (må føres av pasienten)

Pasientens navn med blokkbokstaver